

**Zur chemischen Struktur des Frangulin B
aus *Rhamnus frangula* L. und der
Cascaroside aus *Rhamnus purshianus* DC.**

1973

Günter Demuth



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548326_0022

Zur chemischen Struktur des Frangulin B aus Rhamnus

frangula L. und der Cascaroside aus

Rhamnus purshianus DC.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Günter Demuth

aus

Kiefersfelden

Dezember 1972



Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 1973

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Strukturaufklärung von Frangulin B aus der Rinde von <i>Rhamnus frangula</i> L. (Faulbaumrinde)	2
I. Bisherige Arbeiten zur Strukturaufklärung der Franguline	2
II. Eigene Arbeiten zur Strukturaufklärung von Frangulin B	5
1. Isolierung	5
2. Hydrolyse und chromatographischer Nachweis des Zuckers	5
3. Perjodsäureoxidation	7
4. Perjodatabbau	7
5. NMR-Spektroskopie von Frangulin B und dessen Acetat	9
6. Frangulin-B-Permethyläther	12
7. Massenspektrometrische Untersuchungen	17
8. Gaschromatographische und massenspektrome- trische Untersuchung des partiell metylier- ten Alditolacetates des Frangulin-B-Zuckers	24
9. Spektralphotometrische Bestimmung der D- Apiose	30
B. Isolierung und Beiträge zur Struktur von zwei wei- teren Anthrachinonglucosiden aus der Rinde von <i>Rhamnus frangula</i> L. (Faulbaumrinde)	32
1. Isolierung	32
2. Glykosid I	32
3. Glykosid II	36

C. Reindarstellung von Cascarosid A und B aus der Rinde von <i>Rhamnus purshianus</i> DC. (amerikanische Faulbaumrinde) und Beiträge zur endgültigen Strukturaufklärung	38
I. Bisherige Arbeiten über die Inhaltsstoffe von <i>Cortex Cascarae sagradae</i> (= <i>Cortex Rhamni purshiani</i>)	38
II. Eigene Arbeiten zur Aufklärung der Zuckerverknüpfung bei den Cascarosiden	39
1. Isolierung der Cascaroside A und B	39
2. Hydrolysen	42
3. Quantitative spektralphotometrische Bestimmungen	45
4. Acetylierung der Cascaroside	46
5. NMR-Spektroskopie der Cascaroside	47
6. Spaltung von Cascarosid A und B zu Aloe-emodin-8-O- β -D-glucosid	51
7. Optische Drehung und Circular-Dichroismus	52
8. Strukturbeitrag für die Cascaroside C und D	57
EXPERIMENTELLER TEIL	60
A. Allgemeine Arbeitsmethoden	60
I. Dünnschichtchromatographie	60
II. Präparative Dünnschichtchromatographie	62
III. Papierchromatographie	63
IV. Präparative Papierchromatographie	64
V. Säulenchromatographie	64
VI. Gaschromatographie	64
VII. Präparative Gaschromatographie	65
B. Physikalisch-chemische Untersuchungen	65
C. Strukturaufklärung von Frangulin B	68
I. Isolierung	68
II. Charakterisierung des Zuckeranteils	70
1. Hydrolysen von Frangulin B	70

	Seite
2. Perjodsäureoxidation	70
3. Perjodatabbau	71
III. Derivate von Frangulin B	72
1. Frangulin-B-Pentaacetat	72
2. Frangulin-B-Permethyläther	73
IV. Derivate des Frangulin-B-Zuckers	74
1. Darstellung des Phenylosazons	74
2. Darstellung des Methylzuckers	75
3. Darstellung des Methylzuckeralditolacetates	77
V. Spektralphotometrische Bestimmung der D-Apiose	78
D. Versuche zur Strukturaufklärung von Emodin-8-O-glucosid und Emodin-1-O- oder -8-O-diglucosid	80
I. Isolierung	80
II. Hydrolyse	81
E. Strukturaufklärung der Cascaroside	81
I. Isolierung der Cascaroside A und B	81
II. Hydrolysen	84
1. Saure Hydrolyse	84
2. Enzymatische Hydrolyse	85
III. Quantitative spektralphotometrische Bestimmungen	86
1. Aglykonbestimmung	86
2. Zuckerbestimmung mit der Anthronmethode	87
IV. Cascarosidacetat	89
V. Isolierung von Aloeemodin-8-O- β -D-glucosid	90
VI. Strukturhinweise für Cascarosid C und D	90
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	92

E I N L E I T U N G

Nachdem bekannt ist, daß die pharmakologische Wirkung von Anthrachinon-Drogen in erster Linie auf dem Gehalt ihrer Anthra-Glykoside beruht und eine Wertbestimmung ohne die Einzelbestimmung dieser Glykoside keine exakte Bewertung der Droge erlaubt, hat sich die phytochemische Bearbeitung vor allem auf die Isolierung und Strukturaufklärung dieser Glykoside zu konzentrieren.

Ziel und Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, die noch offenstehenden Strukturen des F r a n - g u l i n B aus der Rinde von Rhamnus frangula L. und der C a s c a r o s i d e aus Rhamnus purshianus DC. auf klassischem Wege und unter Einsatz moderner spektroskopischer Methoden aufzuklären.

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Strukturaufklärung von Frangulin B aus der Rinde von Rhamnus frangula L. (Faulbaumrinde)

I. Bisherige Arbeiten zur Strukturaufklärung der Franguline

Die ersten Isolierungsarbeiten und chemischen Untersuchungen am Frangulin der Faulbaumrinde sind in einer Veröffentlichung von SCHULTZ ¹⁾ zusammengefaßt. Später fanden CASPARIS u. MAEDER ²⁾ ein Primärglykosid des Frangulins, so daß fortan zwei Anthrachinonglykoside Gegenstand eingehender Untersuchungen waren. Bei der chemischen Bearbeitung des Frangulins erkannten erstmals LIEBERMANN u. WALDSTEIN ³⁾, daß es sich bei dem Aglykon um Emodin* handelte, welches OESTERLE u. Mitarb. ⁴⁾ als das 1,6,8-Trihydroxy-3-methyl-anthrachinon aufklärten und von EDER u. WIDMER ⁵⁾ durch Synthese bestätigt wurde, während THORPE u. MILLER ⁶⁾ den Zuckeranteil eindeutig als Rhamnose identifizieren konnten.

In den Jahren 1962/63 gelang dann HÜRHAMMER u. Mitarbeitern ⁷⁾ in unserem Laboratorium durch erstmaligen Einsatz der Polyamid-Chromatographie auf dem Anthrachinongebiet der Nachweis, daß die bisher für einheitlich angesehenen Verbindungen Glucofrangulin und Frangulin jeweils aus zwei Komponenten bestanden. Sie wurden mit A und B bezeichnet. Unterwarf man Glucofrangulin A bzw. B der enzymatischen Hydrolyse, so erhielt man Frangulin A bzw. B. Da BITTNER ⁸⁾ nach der Methylierung der beiden Franguline und Hydrolyse als

* Emodin ist identisch mit der teilweise verwendeten Bezeichnung Frangulaemodin und strukturgleich mit Rheumemodin.

einziges Produkt nur 1,8-Dimethylemodin erhalten hatte, mußte der Zucker bei Frangulin A und B an das C-6-Hydroxyl geknüpft sein.

Eine weitere Bestätigung brachten die Synthesearbeiten von DLUHOSCH ⁹⁾ und HÖRHAMMER ¹⁰⁾. Wegen der größeren Reaktionsfähigkeit der β -ständigen Hydroxylgruppe (C-6) war bei Direktkupplung von Emodin mit α -Acetobromrhamnose vorwiegend ein Emodin-6-O-rhamnosid neben wenig Emodin-1-O- oder -8-O-rhamnosid entstanden. Da die IR-Spektren von Frangulin A und B im Bereich der C-O-Valenz- und OH-Deformationsschwingungen nur geringe Abweichungen zeigten und da DLUHOSCH bei der Synthese nie ein Frangulin B erhalten hatte, vermutete BITTNER im Frangulin B das Vorliegen einer anderen Methylpentose (Methylose) als Rhamnose.

Unabhängig von unserem Arbeitskreis und fast gleichzeitig beschrieben auch SIEPER, LONGO u. KORTE ¹¹⁾ die Existenz zweier Glucofranguline und Franguline. LONGO, MEINARDI u. KORTE ¹²⁾ schlossen aus ihren vorwiegend mit den AB-Gemischen durchgeführten enzymatischen Hydrolysen, daß die beiden Franguline miteinander isomer seien und sich nur in der α - bzw. β -Verknüpfung der Rhamnose mit dem Aglykon unterscheiden. Einen gesicherten Beweis konnten die Autoren nicht liefern.

Im Jahre 1969 gelang es dann WAGNER u. HÖRHAMMER ¹³⁾, das Glucofrangulin A ausgehend von Frangulin A partialsynthetisch darzustellen und strukturell als ein 6-O-(α -L-Rhamnopyranosyl)-8-O-(β -D-glucopyranosyl)-1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinon aufzuklären. Außerdem wurde von HÖRHAMMER u. WAGNER ¹⁴⁾ durch Synthese auch die Struktur des Frangulin A als ein 6-O-(α -L-Rhamnopyranosyl)-1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinon gesichert. Unklar blieb, welcher Art die Unterschiede zu den "isomeren" B-Verbindungen sind.

Im Jahre 1970 veröffentlichten MÜHLEMANN u. LYK ¹⁵⁾ eine Arbeit über die Partialsynthese von α - und β -Frangulin. Das

synthetisierte, chromatographisch "lipophilere" Frangulin entsprach im Schmelzpunkt und IR unserem Frangulin A, während das "hydrophilere" Frangulin, von den Autoren als das β -Isomere angesehen, durch Vergleich der IR-Spektren dem schon von DLUHOSCH ⁹⁾ beschriebenen Synthesenebenprodukt Emodin-1-O- oder -8-O-rhamnosid entsprach. Die von MÜHLEMANN u. LYK erwähnte noch "lipophilere, frangulinähnliche" Substanz in dem Testfrangulin "Fluka" ist nach unseren chromatographischen Überprüfungen mit Frangulin B identisch.

Daß bei der Umsetzung einer α -Acetobromrhamnose mit dem Aglykon ein β -Isomeres entstanden sein soll, ist schon deshalb wenig wahrscheinlich, da nach der Literatur und unseren eigenen Synthesearbeiten Acetobromrhamnose immer ohne Walden'sche Umkehr zu O- α -L-Rhamnosiden kuppelt. Außerdem besitzen alle bisher untersuchten natürlich vorkommenden Glykoside mit Zuckern der L-Reihe α -Konfiguration, von einigen Ausnahmen bei Polysacchariden und Bakterienkohlenhydraten abgesehen. Auch das als β -L-Rhamnosid beschriebene Quercitrin ¹⁶⁾ erwies sich nach den NMR-Messungen eindeutig als α -verknüpft. Ebenso enthält Muricatin ¹⁷⁾, eine 1,4-Dirhamnopyranosido-(+)-11-hydroxy-hexadecansäure, in Übereinstimmung mit der KLYNE-Regel nicht eine β -, sondern eine α -verknüpfte Rhamnose.

Damit gewann die Vermutung von BITTNER, daß die Unterschiede zwischen Frangulin A und B im Zuckeranteil begründet sein könnten, wieder an Realität.

II. Eigene Arbeiten zur Strukturaufklärung von Frangulin B

1. Isolierung

Die Isolierung führten wir im Prinzip nach der Vorschrift von BITTNER ⁸⁾ durch. Bei der Extraktion der Droge mit verschiedenen Lösungsmitteln fanden wir, daß die BITTNER-Methode mit Äthylacetat zwar größere Ausbeuten an Frangulinen ergab, daß aber der Äther-Extrakt an Begleitstoffen ärmer war. Die Auftrennung des so erhaltenen Frangulin-AB-Gemisches erfolgte durch Polyamid-Säulenchromatographie, wobei wir zweimal über Polyamid mit der Korngröße 100-150 μm und einmal über Polyamid mit der Korngröße bis 60 μm trennten.

Das hierbei erhaltene Frangulin B stimmte im Schmelzpunkt, UV- und IR-Spektrum völlig mit den von BITTNER ⁸⁾ angegebenen Daten überein. Das gleichzeitig erhaltene Frangulin A war ebenfalls mit der früheren Substanz identisch. Dünnschichtchromatographisch waren beide Franguline auf Polyamid gut voneinander zu trennen. Die Werte der Elementaranalyse von Frangulin B sprachen für eine andere Bruttoformel als die von Frangulin A.

2. Hydrolyse und chromatographischer Nachweis des Zuckers

Bei der salzsauren Hydrolyse von Frangulin B und parallel dazu von Frangulin A erhielt man zwar in beiden Fällen Emodin als Aglykon, doch war nur beim Frangulin A Rhamnose als Zucker nachweisbar. Bei Frangulin B fanden wir papierchromatographisch in der Hydrolyselösung keinen Zucker. Deshalb wiederholten wir die Hydrolyse einmal mit einem Gemisch aus Salzsäure-Eisessig-Wasser nach KILIANI ¹⁸⁾, eine Methode, die für schwer spaltbare Glykoside verwendet wird, und zweitens mit 0.05 N und 2.5 %iger methanolisch-wässriger Schwe-

felsäure, ein Verfahren, das für leicht hydrolysierbare Glykoside, z.B. mit 2-Desoxyzuckern geeignet ist ¹⁹⁾. Die letzte Methode erwies sich in der Säurekonzentration am günstigsten. Allerdings muß bei der Frangulin-B-Spaltung die 2 - 3fache Menge eingesetzt werden, um auf dem Chromatogramm überhaupt eine positive Zuckerreaktion zu erhalten.

Die enzymatische Hydrolyse von Frangulin B mit Emulsin, β -Glucosidase und Naringinase lieferte wiederum Emodin; jedoch wurde nur ein sehr geringer Teil des Frangulin B gespalten.

Die vom Aglykon befreite wäßrige Zuckerlösung der Frangulin-B-Hydrolyse untersuchten wir mit verschiedenen chromatographischen Methoden: Für die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir als Adsorbentien neben Kieselgel- und Celluloseschichten auch imprägnierte Kieselgel- und Kieselgurschichten nach STAHL ²⁰⁾. Als Sprühreagentien benützten wir u.a. Anisaldehyd-Schwefelsäure, Naphthoresorcin-Schwefelsäure und p-Anisidinphthalat. Auf Grund der in der Literatur angegebenen Färbungen und des Vergleichs mit verschiedenen Testzuckern konnte keine Identität mit einem der bekannten Zucker festgestellt werden. Die untersuchte Zuckerlösung trennte sich in 3 Flecken auf, von denen jeweils der Hauptfleck einen R_f -Wert nahe der Rhamnose hatte.

Auf Papierchromatogrammen lieferten die Zuckerlösungen von Glucofrangulin B wie von Frangulin B im System Butanol-Eisessig-Wasser nach Besprühen mit Anilinphthalat einen schwach ockerbraunen Fleck ($R_f = 0.48$), knapp oberhalb von Rhamnose ($R_f = 0.45$). Bezieht man auf Rhamnose ($R_{Rh} = 1.0$), so ergibt sich für den ockerbraunen Fleck bei einer Entwicklungsdauer von 45 Stunden ein R_{Rh} von 1.06.

Damit war eindeutig gezeigt, daß Frangulin B im Gegensatz zu Frangulin A keine Rhamnose enthält, sondern einen anderen Zucker, der dem R_f -Wert nach im Bereich der Methylosen

liegt. Gleichzeitig waren damit die Anschauungen von LONGO, MEINARDI u. KORTE ¹²⁾ sowie von MÜHLEMANN u. LYK ¹⁵⁾, die die Franguline für O- α - bzw. - β -Rhamnoside hielten, widerlegt.

3. Perjodsäureoxidation

Zur näheren Charakterisierung des noch unbekannten Zuckers verwendeten wir die Perjodsäureoxidation. Diese erstmals von MALAPRADE ²¹⁾ beschriebene Reaktion beruht auf der Spaltung von C-C-Bindungen mit vicinalen Hydroxylgruppen, α -Hydroxyaldehyden und α -Hydroxyketonen durch Natriummetaperjodat im sauren Medium. Dem Verbrauch von einem Mol Perjodat entspricht eine C-C-Spaltung. Quantitativ kann die Malaprade-Reaktion durch Bestimmung des Perjodatverbrauchs, der gebildeten Ameisensäure oder des Formaldehyds ausgewertet werden.

Wir bestimmten den Perjodatverbrauch von Frangulin B und zum Vergleich den von Frangulin A sowie von Quercitrin (= Quercetin-3-O-rhamnosid).

Der theoretische Verbrauch für Rhamnose liegt bei 4 Mol Perjodat. Wir erhielten bei den von uns untersuchten Monorhamnosiden durchschnittlich niedrigere Werte, z.B. für Quercitrin 3.6 Mol und für Frangulin A 3.4 Mol. Der Verbrauch für Frangulin B lag bei 2.8 Mol. Hieraus ist zu schließen, daß bei Frangulin B nur 3 C-C-Bindungen gespalten wurden, d.h. daß auf Grund dieses Ergebnisses z.B. eine 2-Desoxyhexose vorliegen könnte.

4. Perjodatabbau

Führt man die Oxidation des Zuckers mit Natriummetaperjodat in neutralem Milieu durch, reduziert den hierbei entstandenen Dialdehyd mit Natriumborhydrid und hydrolysiert anschließend Acetal- und Glykosidbindung ^{22) 23)}, so erhält man je nach Zuckerstruktur die Polyalkohole Glycerin (aus

Aldohexosen wie Glucose, Galaktose, Mannose in Pyranoseform oder aus Pentosen wie Arabinose, Xylose, Ribose in Furanoseform), Äthylenglycol (aus Pentopyranosiden, wie Arabinose, Xylose) oder Propylenglycol (aus Methylosen wie Fucose, Rhamnose, Quinovose) und bei O-Glykosiden noch zusätzlich Glycolaldehyd. Wir erhielten für Frangulin B Äthylenglycol nur in geringer Menge und in einigen Versuchen auch Glycerin in Spuren, während Frangulin A Propylenglycol lieferte.

Auf Grund dieses Ergebnisses ist für Frangulin B eine Methylose auszuschließen; dagegen kann keine eindeutige Entscheidung getroffen werden, ob der Zucker in Furanose- oder Pyranoseform vorliegt. Auffallend war noch, daß Frangulin B sofort nach Natriumborhydrid-Zugabe kräftig dunkelrot gefärbt wurde, während bei Frangulin A erst nach längerem Stehen eine rotbraune Färbung auftrat.

Zur Darstellung des Frangulin-B-Acetates acetylierten wir ein Frangulin-AB-Gemisch mit überwiegendem Frangulin-B-Anteil mit Essigsäureanhydrid-Pyridin und trennten das gewonnene Acetat über eine Kieselgelsäule. Der Schmelzpunkt des Frangulin-B-Acetates betrug $167 - 169^{\circ}\text{C}$ und entsprach dem von HÖRHAMMER u. BITTNER ²⁴⁾ bereits früher erhaltenen Pentaacetat. Die damalige CH- und Acetylgruppenbestimmung paßte allerdings auf ein mit einer Methylose glykosidiertes Emodin.

BITTNER hatte Frangulin A als Tetraacetat und Frangulin B als Pentaacetat erhalten. HÖRHAMMER u. WAGNER ¹⁴⁾ konnten aber zeigen, daß Frangulin A ein Pentaacetat liefert; somit war auch beim Frangulin-B-Acetat eine nochmalige Überprüfung der Anzahl der Acetylgruppen erforderlich.

Auffallenderweise zeigten die Acetate von Frangulin A und B ein umgekehrtes chromatographisches Verhalten wie die freien Glykoside, d.h. das Frangulin-B-Pentaacetat (siehe S. 11) hatte einen niedrigeren R_f -Wert als das Frangulin-A-Pentaacetat. Möglicherweise ist beim Frangulin B eine OH-Gruppe

des Zuckers sterisch behindert oder durch Wasserstoffbrückenbindung kaschiert.

5. NMR-Spektroskopie von Frangulin B und dessen Acetat

Weitere Hinweise zur Zuckerstruktur sollte die NMR-Spektroskopie bringen.

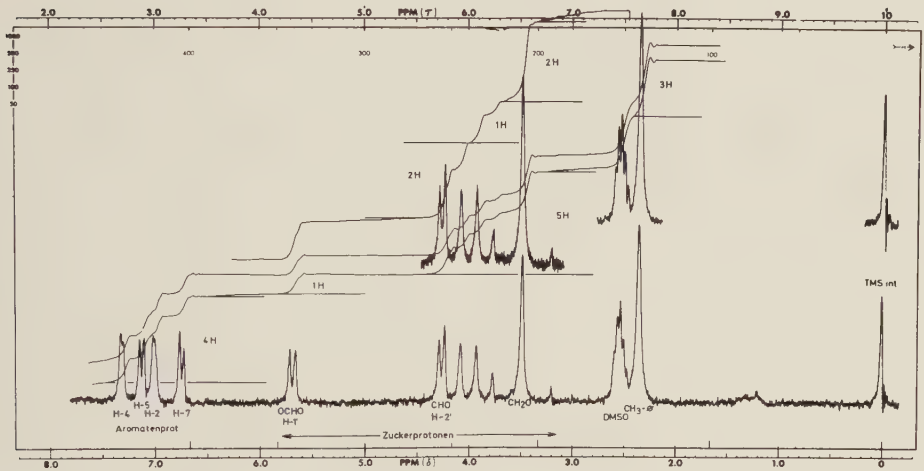
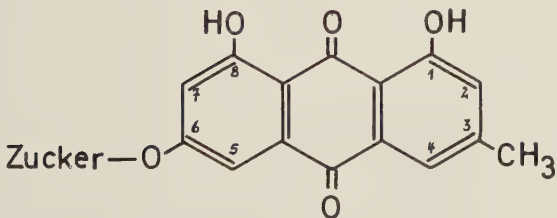


Abb. 1
NMR-Spektrum des Frangulin B



Übersichtsformel von Frangulin B

Das in $(\text{CD}_3)_2\text{SO} + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ aufgenommene NMR-Spektrum von Frangulin B erlaubt folgende Zuordnung:

Im Bereich von $\delta = 6.7 - 7.4$ erscheinen die aromatischen Protonen, wobei die Signale $\delta = 7.32$ für H-4 und $\delta = 7.01$ für H-2 mit der gleichen Kopplungskonstanten von je 1.5 Hz, $\delta = 7.13$ für H-5 und $\delta = 6.75$ für H-7 mit $J = 2.5$ Hz zuzuordnen sind. Das bei $\delta = 2.35$ liegende Singulett stammt von der kernständigen Methylgruppe.

Ein für Methylosen typisches Dublett bei $\delta \sim 1.2$ fehlte. Die im Bereich von $\delta = 3.2 - 5.8$ liegenden und für 6 Protonen integrierenden Signale stammen vom Zucker. Das Dublett bei $\delta = 5.69$ mit einer Kopplungskonstanten von 3 Hz wird von dem anomeren Proton geliefert. Wie das Entkopplungsexperiment bestätigt, handelt es sich bei dem Dublett $\delta = 4.27$ um das CH-2'-Proton. Bei Vorliegen einer Pentopyranose könnte sich diese Kopplungskonstante aus einer ax-eq Kopplung ergeben.

Die beiden als Dubletts erscheinenden Protonen bei $\delta = 4.16$ und $\delta = 3.85$ mit der Kopplungskonstanten von je 9.5 Hz dürften keine weiteren Protonen als Nachbarn haben. Möglich wäre allerdings noch, daß es sich um zwei geminale Protonen handelt, welche keine vicinalen H-Nachbarn besitzen.

Das Triplett bei $\delta = 3.49$ mit $J = 16.5$ Hz integriert für 2 Protonen und ist für eine $-\text{CH}_2\text{O}$ -Gruppe typisch.

Die aromatischen Protonen im NMR-Spektrum des Frangulin-B-Acetates in CDCl_3 ($\delta = 7 - 8$) und die Protonen des Zuckers ($\delta = 4.2 - 5.8$) sind erwartungsgemäß paramagnetisch verschoben. Das CH-2' des Zuckers, besonders entschirmt, erscheint bei $\delta = 5.67$. Die fast verschwundene Kopplung mit CH-1' wäre durch eine Annäherung des Winkels dieser beiden Protonen an 90° erklärbar.

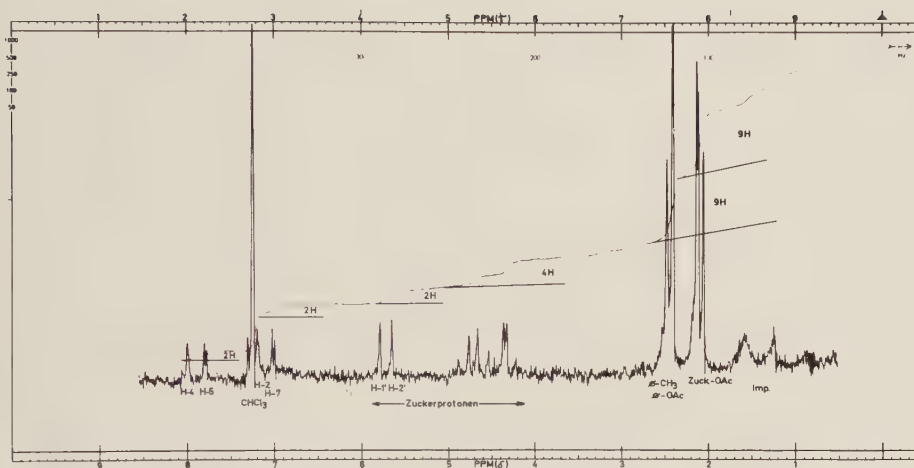


Abb. 2

NMR-Spektrum des Frangulin-B-Acetates

Die Dubletts bei $\delta = 4.83$ und $\delta = 4.60$ mit der Kopplungskonstanten von je 13 Hz sowie bei $\delta = 4.42$ und $\delta = 4.28$ mit der Kopplungskonstanten 11 Hz (integriert für insgesamt 4 Protonen) können sich jeweils aus zwei getrennten geminalen Kopplungen ergeben.

2 Singulets bei $\delta = 2.41$ und $\delta = 2.48$ (integriert für insgesamt 9 Protonen) repräsentieren die kernständige Methylgruppe und die aromatischen Acetylgruppen in 1- und 8-Stellung.

Die Integration über die 3 Singulets bei $\delta = 2.06$, 2.11 und 2.13 ergibt 9 Protonen, entsprechend 3 Acetylgruppen für den Zucker.

Die Interpretation dieser beiden NMR-Spektren ergibt für den "Frangulin-B-Zucker" eindeutig 6 Protonen und 3 OH-Gruppen.

6. Frangulin-B-Permethyläther

Die weitere Untersuchung des unbekannten Zuckers sollte durch Massenspektrometrie eines entsprechenden Methylderivates erfolgen. Zur Permethylierung von Kohlenhydraten und Glykosiden haben PURDIE ²⁵⁾, HAWORTH ²⁶⁾ u. KUHN ^{27) 28)} eine Reihe von Verfahren entwickelt. Die bewährtesten sind von WALLENFELS u. Mitarb. ²⁹⁾ zusammenfassend beschrieben. Als Agentien werden Dimethylsulfat (DMS) oder Methyljodid, als säurebindende Mittel Natronlauge, Silberoxid, Bariumoxid, Bariumhydroxid und als Lösungsmittel N,N-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Mischungen von DMF und DMSO vorgeschlagen. Der Nachteil nahezu aller Methoden ist, daß sie mit geringeren Substanzmengen als 100 mg wenig erfolgreich verlaufen.

Für die Permethylierung von Frangulin B wählten wir zunächst eine von AURNHAMMER ³⁰⁾ entwickelte Methode für den Halbmikromaßstab. Hierzu methylierten wir unsere in DMF gelöste Substanz mit DMS unter Stickstoffatmosphäre. Trotz Sikkon-Zusatz und einer Methylierungsdauer von 5 Tagen lieferte das nur in geringer Menge erhaltene Methylierungsprodukt im Chromatogramm 7 Flecke. Die Methylierung von Frangulin-B-Acetat brachte keine wesentliche Verbesserung und auch die Nachmethylierung erwies sich wegen des weiteren Substanzverlustes als ungünstig.

Dagegen ergab die Methylierung mit dem aktiveren Methyljodid ein einheitlicheres Produkt. Chromatographisch überwogen 3 Flecken, die, wie die anderen Produkte geringerer Konzentration, im langwelligen UV dunkelgrün fluoreszierten.

Nach unseren Erfahrungen empfiehlt es sich, bei ausreichender Löslichkeit einer Substanz in DMF ohne DMSO zu arbeiten,

da dann bei der Gewinnung des Methylproduktes die azeotrope Destillation rascher verläuft.

Das gewonnene Methylprodukt hydrolysierten wir durch 5-stündige Behandlung mit methanolischer Salzsäure.

Um den Methylzucker von Frangulin B aus dem Methylglykosid zu erhalten, hydrolysierten wir nach Entfernung des Methanols nochmals 1 Std.

Da die Abtrennung des partiell methylierten Emodins nicht quantitativ gelang und bei der Permethylierung des Frangulin-AB-Gemisches auch 2,3,4-Trimethylrhannose entstanden war, trennten wir den unbekannten Methylzucker auf dünn-schichtchromatographischem Wege ab ³¹⁾. Die entnommenen Kieselgelzonen wurden mehrmals mit Chloroform eluiert und anschließend dünn-schicht-, papier-, gaschromatographisch und später nach präparativer Gaschromatographie massenspektrometrisch untersucht.

In dem von AURNHAMMER ³⁰⁾ angewandten System (Benzol-Äthanol 8:2) erhielten wir dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel HF das in Abb. 3 gezeigte Bild. Die Verbindung mit dem niedrigeren R_F -Wert sollte demnach der Methylzucker von Frangulin B sein.

Papierchromatographisch untersuchten wir den Methylzucker nach der Methode von HIRST, HOUGH u. JONES ³²⁾. Diese bezogen die R_F -Werte der von ihnen untersuchten Substanzen auf den Standard 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose mit dem $R_{TG} = 1.0$. Unser noch unbekannter Methyläther hatte einen R_{TG} von 0.94 (siehe Tabelle 1) und entsprach damit keinem in der Literatur angegebenen Wert ³³⁾.

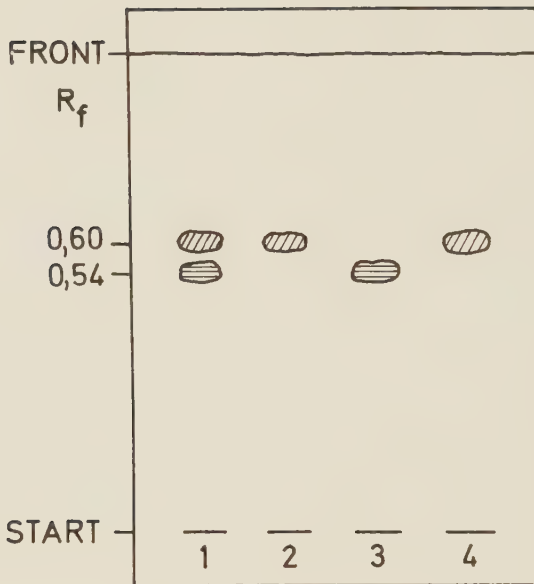


Abb. 3

Dünnschichtchromatogramm der Methylzucker

Kieselgel HF, Benzol-Äthanol (8:2), Anilin-phthalat

1 = Methylzucker von Frangulin AB

2 = Methylzucker von Frangulin A (dunkelbraun)

3 = Methylzucker von Frangulin B (ockerbraun)

4 = Test 2,3,4-Trimethylrhamnose (dunkelbraun)

T a b e l l e 1

Auf- oder absteigende Papierchromatographie des Methylzuckers (R_{TG} -Wert)

(Bezugssubstanz 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose)

Substanz	R_{TG}	Farbe
2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose	1.00	rotbraun
2,3,4-Tri-O-methylrhamnose	1.02	graubraun
2,3-Di-O-methylrhamnose	0.90	graubraun
Methylzucker von Frangulin B	0,94	ocker

Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b

Laufmittel: n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase)

Sprühreagens: Anilinphthalat

Über die Auftrennung von permethylierten Monosacchariden mit Hilfe der Gaschromatographie berichteten als erste McINNES u. Mitarb.³⁴⁾. Die Arbeiten von KIRCHER³⁵⁾, BISHOP u. COOPER³⁶⁾ und BAYER u. WIDDER³⁷⁾ bedeuteten einen weiteren Fortschritt in der Trennung von anderen permethylierten und partiell methylierten Glykosiden sowie stereoisomeren Furanose-, Pyranose- und Septanoseformen. ASPINALL³⁸⁾ gibt Retentionszeiten von voll und teilweise methylierten Methylglykosiden bezogen auf Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl- β -D-glucopyranosid an. Die neueste, sehr ausführliche Literaturzusammenfassung von gaschromatographisch geeigneten Kohlenhydratderivaten veröffentlichten CLAMP u. Mitarb.³⁹⁾. Eine Übersicht speziell über die GC von methylierten Zuckern stammt von JONES⁴⁰⁾.

Wir chromatographierten freie Methylzucker unter Verwendung von Polyphenyläther³⁸⁾ und dem zweidimensionalen Polyester

LAC-2R-446 35) 40) 41) als flüssige Phasen. Mit dem Polyester war die Abtrennung des Frangulin-B-Methylzuckers von der 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose besser als mit Polyphenyläther.

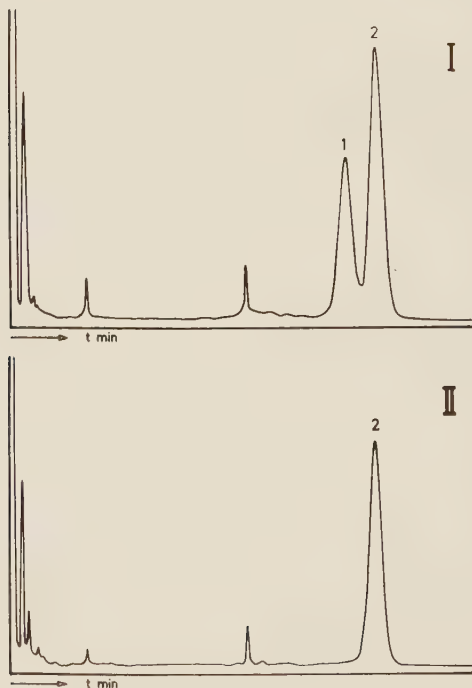


Abb. 4

Gaschromatographie der Methylzucker von

I = Frangulin-AB-Gemisch

II = Frangulin B

20 % LAC-2R-446 auf Chromosorb WS, Säulentemperatur 168°C

1 = 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose von Frangulin A
(übereinstimmend mit Testsubstanz)

2 = Methylzucker von Frangulin B

Zur massenspektrometrischen Analyse verwendeten wir einen Methylzucker, der durch präparative Gaschromatographie weiter gereinigt war.

7. Massenspektrometrische Untersuchungen

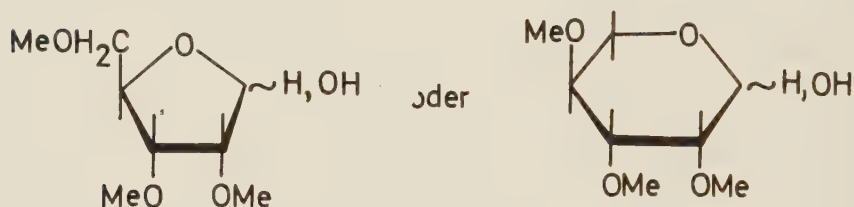
Wegen der größeren Flüchtigkeit werden heute Kohlenhydrate massenspektrometrisch in Form verschiedener Derivate, insbesondere ihrer Methylprodukte untersucht. Allerdings ist die Bestimmung des Molekulargewichtes von Zuckerderivaten problematisch. Die Intensität der Molekül-Peaks ist, wenn man von den Mercaptalen und Phenyllosazonen absieht, sehr gering oder die Signale für die Molekülionen fehlen vollständig. Obwohl wir in gesonderten Versuchen mit verminderter Elektronenenergie von 12 eV und abgekühlter Ionenquelle arbeiteten, erhielten wir auch bei unserem Methylzucker keinen Molekül-Peak.

Wir verwendeten daher die Feldionisations-Massenspektrometrie (FI-MS), die den Vorteil gegenüber der Elektronenstoß-Massenspektrometrie (ES-MS) hat, daß sie auch in den Fällen, bei denen das Molekülion kaum oder gar nicht nachweisbar ist, recht intensive Molekül-Peaks liefert. Die Feldionisierung tritt ein, wenn Moleküle in den Einflußbereich eines hohen elektrischen Feldes gelangen. Die Ionisierungswahrscheinlichkeit nimmt mit der Feldstärke zu. Zur Ionisierung ist nicht die ganze Ionisierungsenergie nötig, da die Ablösung eines Elektrons auf dem quantenmechanischen Tunneleffekt beruht, d.h. das Elektron muß zur Abtrennung den durch das elektrische Feld bedingten Potentialberg nicht überwinden, sondern kann diesen auch mit endlicher Wahrscheinlichkeit durchqueren⁴²⁾. Die hohen elektrischen Felder werden durch stark gekrümmte, elektrisch leitende Elektrodenoberflächen erzeugt (3-5 µm Drahtdurchmesser).

Da die NMR-Spektroskopie von Frangulin B und Frangulin-B-

Acetat 6 Protonen bzw. 3 acetylierbare OH-Gruppen für den Zucker ergeben hat, kann für den Frangulin-B-Methylzucker eine Trimethylpentose in furanoider oder pyranoider Form postuliert werden:

z.B.: (ohne Berücksichtigung der sterischen Anordnung)



Die Messung mit einem einfach fokussierenden FI-Massenspektrometer ergab als Molekulargewicht 192, was mit beiden vorgeschlagenen Strukturen übereinstimmt. Ein dreimal intensiver $(M+1)^+$ -Peak stammt von einer Proton-Transfer-Reaktion⁴³⁾. Der Basispeak bei m/e 175 ist durch Abspaltung von 1 Mol H_2O aus dem $(M+1)^+$ -Peak erklärbar. Ein ebenfalls sehr intensiver $(M+2)^+$ -Peak dürfte durch Ringöffnung und Anlage von 2 H-Atomen an der Oberfläche des FI-Emitters entstanden sein.

Eine weitere Analyse zur Bestätigung des Molekulargewichtes wurde mit dem peracetylierten Frangulin B nach der Felddesorption(FD)-Methode durchgeführt. Diese von BECKEY⁴⁴⁾ entwickelte Methode vergrößert gegenüber der normalen FI-Technik den Anteil der Molekülionen noch weiter. Sie besitzt eine noch größere Nachweisempfindlichkeit und zeichnet sich durch eine stark verminderte thermische Zersetzung der Probe aus.

An der unter Benützung von Benzonitril stark vergrößerten Feldionenemitter-Oberfläche wird die Substanz adsorbiert und bei der Messung felddesorbiert.

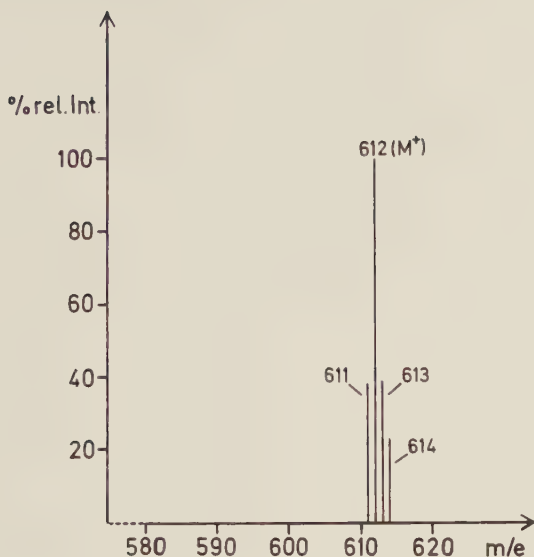


Abb. 5

Felddesorptionsspektrum des Frangulin-B-Pentaacetates
(Auflösungsvermögen $R_{10\%Ta1} = 3000$, elektrisch registriert)

Unter Berücksichtigung der früheren Ergebnisse war für das Frangulin-B-Pentaacetat ein Molekül-Peak von 612 zu erwarten. Dieser Peak, von höchster Intensität, war aber nicht der mit größter Masse. Wiederum trat ein $(M+2)^+$ -Peak auf. Dieser dürfte ähnlich wie bei der FI-Methode entstanden sein. Denkbar wäre allerdings auch eine partielle Hydrierung des Chinons, wie sie von MURACA u. Mitarb.⁴⁵⁾ beim Ubichinon festgestellt wurde.

Die thermische Stabilität der Verbindung und die Intensitäten der erhaltenen Signale waren bemerkenswert hoch. Wie der

Parallelversuch mit der photographischen Aufnahme des FD-Spektrums zeigte, entsprachen mehrere Fragmentationen im mittleren und unteren Massenbereich denen im ES-Spektrum.

Aus dem FI-MS des methylierten Zuckers und dem FD-MS des Frangulin-B-Pentaacetates errechnet sich nach Abzug der Schutzgruppen und des Aglykons für den Zucker ein Molekulargewicht von 150.

Auch die ES-MS des Frangulin-B-Pentaacetates führt zu diesem Ergebnis:

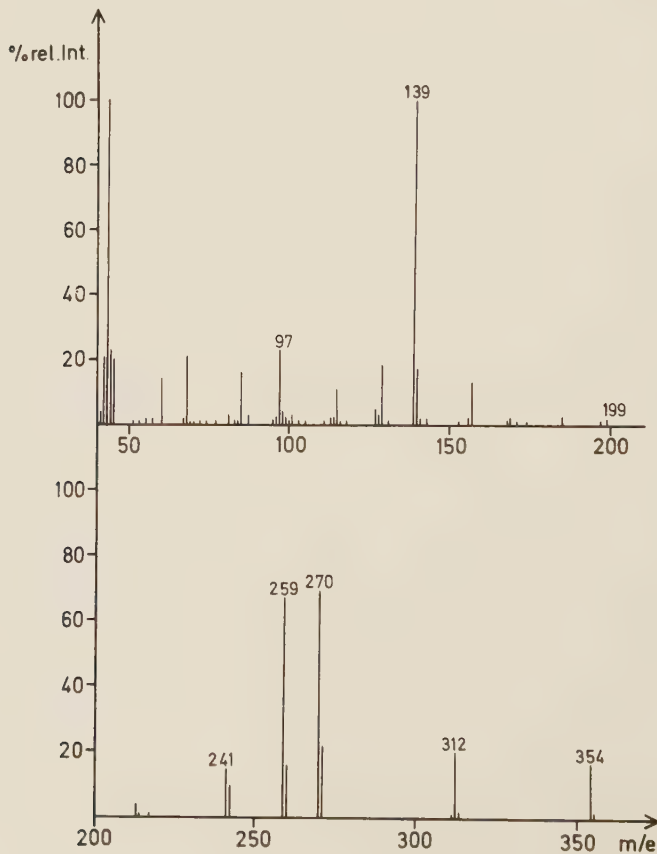
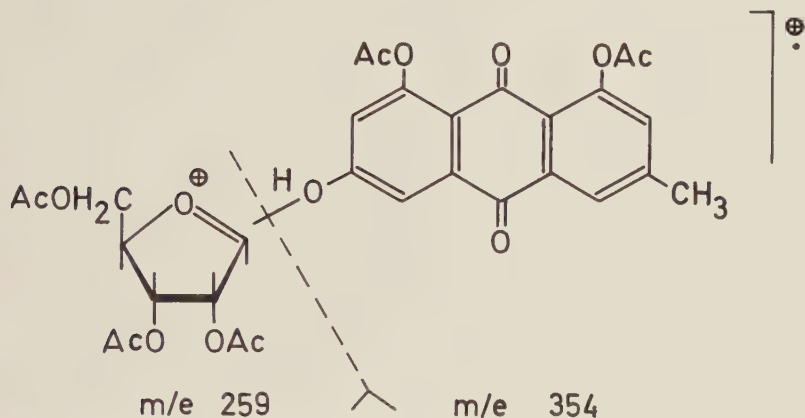


Abb. 6

Durch thermische Fragmentierung wurde der acetylierte Zuckeranteil abgespalten und als m/e 259 registriert:
z.B.: (ohne Berücksichtigung der sterischen Verhältnisse)



Dieses Ion stellt nicht das Molekülion dar, ist aber für acetylierte Pentosen typisch ⁴⁶⁾. Die zweimalige Abspaltung von Essigsäure und die Eliminierung von Keten ist durch metastabile Ionen gesichert und führt zu den Fragmentationen der Masse m/e 199, 139 und 97. Diese Signale treten im ES-MS von Emodintriacetat nicht auf.

Da die ES-MS fast alle Zuckerderivate ohne die Molekül-Peaks liefert, führte ITO ⁴⁷⁾ die Messung mit Phenylsazonen von Monosacchariden durch. Diese enthielten eindeutig die Signale für die Molekülionen. Das Molekülion des Phenylsazons der Frangulin-B-Pentose lag wie erwartet bei m/e 328 mit einer relativen Intensität von 60 %.

Die genaue Kenntnis des Molekulargewichtes unseres Zuckers ermöglichte nunmehr eine detaillierte Interpretation des ES-

MS der Frangulin-B-Trimethylpentose:

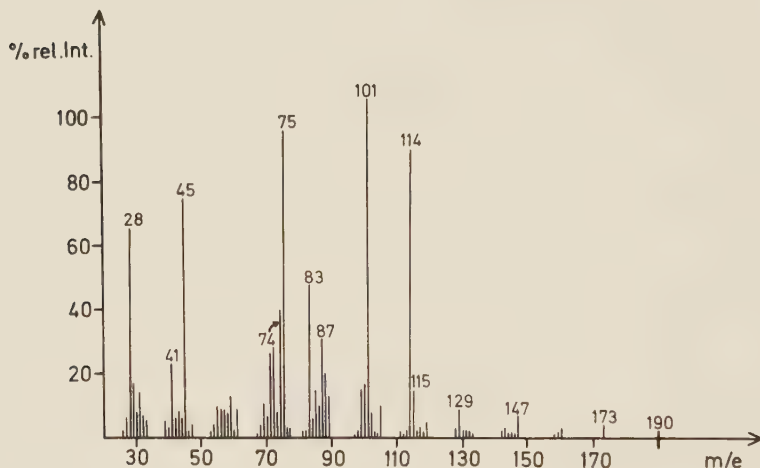
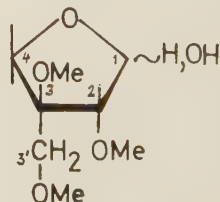
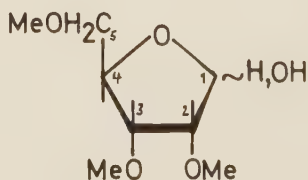
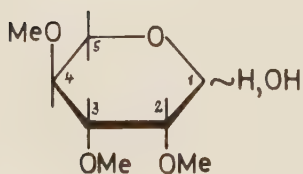


Abb. 7

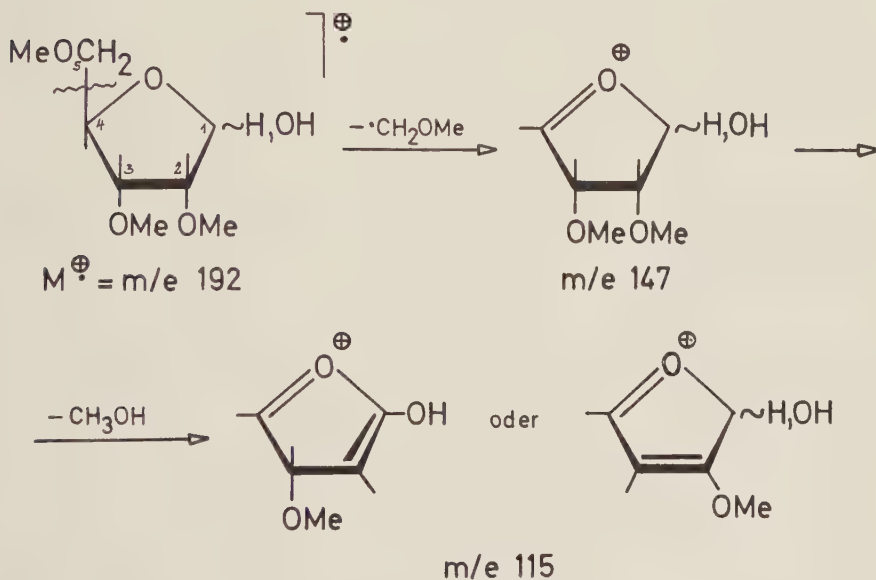
ES-Massenspektrum der Frangulin-B-Trimethylpentose

Ohne Berücksichtigung der Stereochemie lassen sich eine Pyranosestruktur und zwei Furanosestrukturen diskutieren:



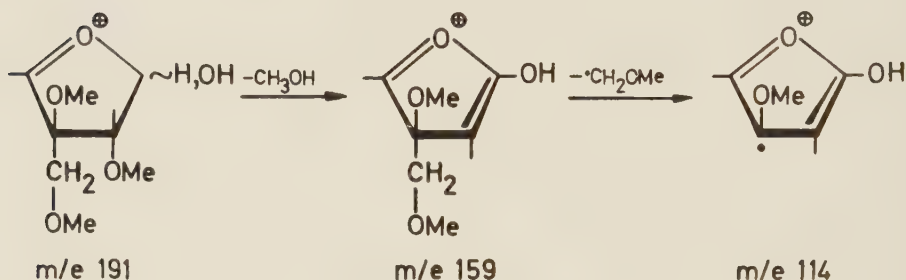
Von diesen drei möglichen Strukturen konnte die Pyranosestruktur auf Grund der massenspektrometrischen Fragmentie-

rung ausgeschieden werden. Methylierte Pentofuranoside und -furanosen zeigen nämlich einen typischen Abbauweg, der mit der Spaltung der C-4/C-5- bzw. der C-3/C-3'-Bindung beginnt. Bei unserem Trimethylzucker fanden wir ausgehend von m/e 192 die Fragmentionen m/e 147 und m/e 115. Diese beiden ließen sich zwanglos durch Abspaltung von 45 Masseneinheiten entsprechend einem Verlust von $\cdot\text{CH}_2\text{-OMe}$ und einer weiteren Abspaltung von CH_3OH erklären:



Die anderen Massenpeaks, mit Ausnahme von m/e 114, konnten wir mit den von HEYNS u. Mitarb. ⁴⁶⁾ für permethylierte Methyl-Pentofuranoside und von KOCHETKOV u. Mitarb. ⁴⁸⁾ ⁴⁹⁾ für 2,3,5-Tri-O-methylarabofuranose und für Methyl-2,3,5-tri-O-methylarabofuranosid beschriebenen Zerfallsmechanismen interpretieren.

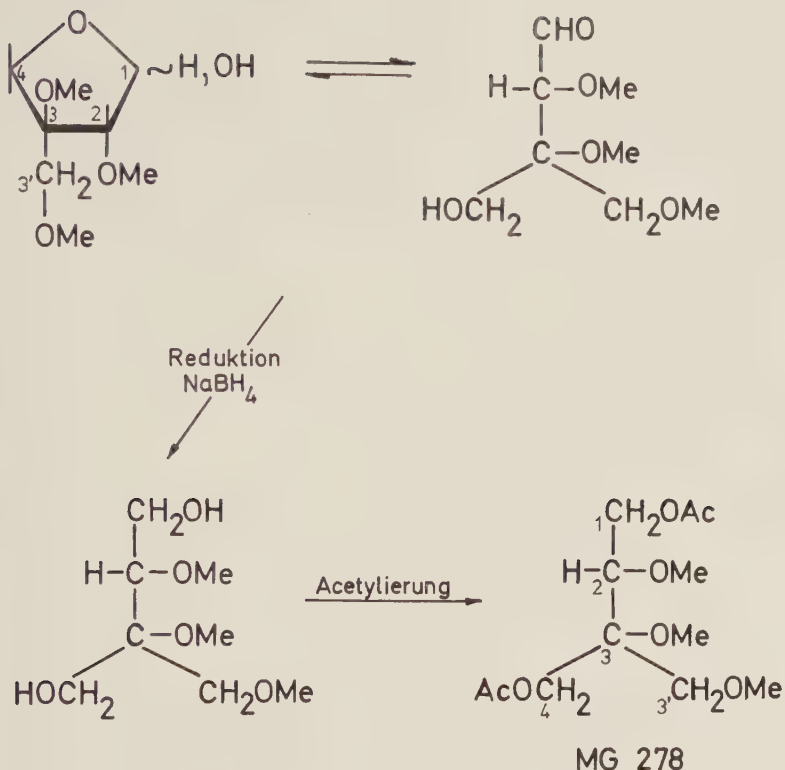
Das m/e 114 Ion war allerdings nur für eine verzweigte Pentofuranose erklärbar, wenn man den nachfolgenden Fragmentierungsmechanismus annimmt:



Ein derartiger Zucker ist natürlich vorkommend unter dem Namen Apiose bekannt.

8. Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchung des partiell methylierten Alditolacetates des Frangulin-B-Zuckers

Nach BJÖRNDAL, LINDBERG u. SVENSSON ⁵⁰⁾ eignen sich für die massenspektrometrische Untersuchung vor allem partiell methylierte Alditolacetate, die man aus Methylzuckern durch Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließende Acetylierung erhält ⁵¹⁾. Die gaschromatographisch auf ECNSS-M-(Silicon-Polyester)- oder Polyphenyläther OS 138-Säulen getrennten Derivate können sofort massenspektrometrisch untersucht werden. Für den letzten Strukturvorschlag ist diese Umwandlung formelmäßig dargestellt:



Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, daß nur eine außerordentlich geringe Substanzmenge (ca. 1 mg des Methylzuckers) erforderlich ist. Außerdem erscheint gaschromatographisch für ein Methylzuckerderivat nur ein Peak, da durch die Reduktion zu den Alkoholen keine anomeren Formen mehr auftreten.

Die Retentionszeiten der Alditolacetate von methylierten Zuckern werden auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol ($R_{\text{TGlucit.}} = 1.0$) bezogen. Durch die Verwendung von

zwei internen Standards mit stark unterschiedlichen Retentionszeiten erreicht man eine gute Reproduzierbarkeit der $R_{TGlucit.}$ -Werte. Das Alditolderivat unseres Zuckers hatte, verglichen mit 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol und 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol als innere Standards, einen $R_{TGlucit.}$ von 0.52. Dieser stimmte mit keinem der von BJÖRNDAL, HELLERQUIST, LINDBERG u. SVENSSON ⁵²⁾ für eine Reihe von Methylalditolacetaten angegebenen Retentionszeiten überein.

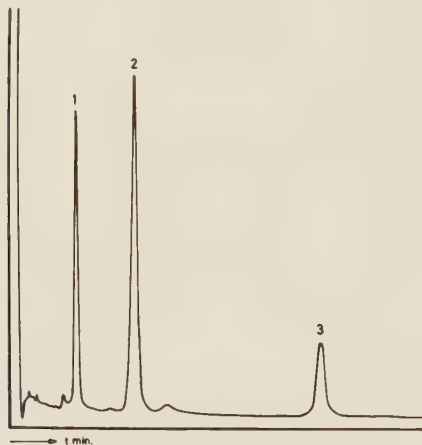


Abb. 8

Gaschromatographie des Methylzuckeralditolacetates
ECNSS-M 3% auf Gaschrom Q, Säulentemperatur 158°C

- 1 = Di-O-acetyl-tri-O-methylalditol von Frangulin B
($R_{TGlucit.} = 0.52$, graphisch interpoliert)
- 2 = innerer Standard: 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol ($R_{TGlucit.} = 1.0$)
- 3 = innerer Standard: 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol ($R_{TGlucit.} = 2.5$)

Das nach gaschromatographischer Reinigung (Polyphenyläther OS 138 SCOT-Säule) aufgenommene Massenspektrum zeigte als Signal mit höchster Massenzahl das Primärfragment m/e 233, das bei den in der Literatur angegebenen Trimethylalditol-acetaten von Pentosen bisher nicht beobachtet wurde.

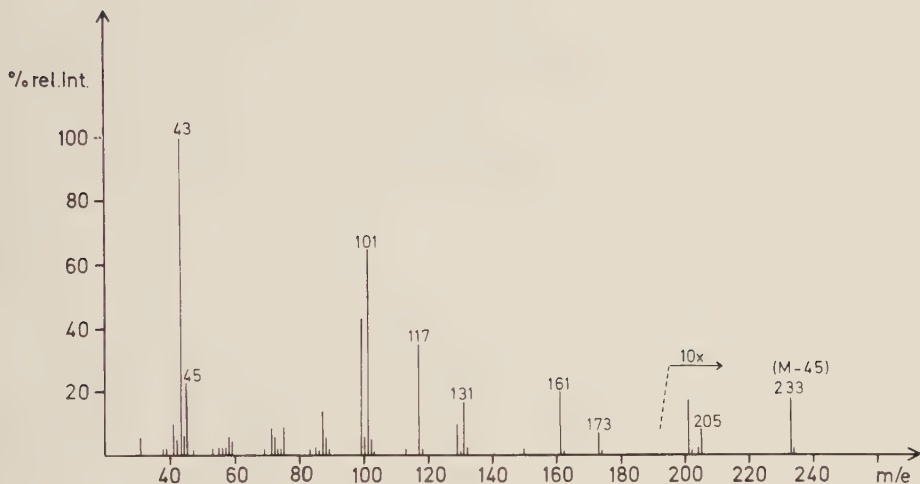
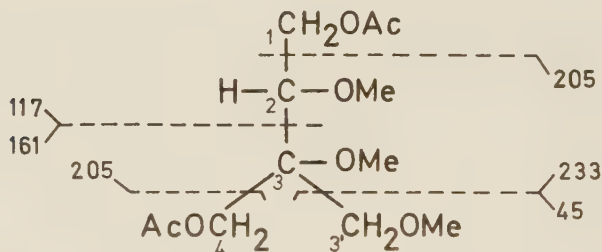


Abb. 9

ES-Massenspektrum des Di-O-acetyl-tri-O-methylalditols des Frangulin-B-Zuckers (MG 278)

Nach den Fragmentierungsregeln von BJÖRNDAL u. Mitarb. ⁵⁰⁾
⁵²⁾ kann das Signal m/e 233 = $(M-45)^+$, entsprechend einer Abspaltung von $^*CH_2-OMe$, aus partiell methylierten Alditol-acetaten von normalen Pentosen nicht entstehen. Nach der Primäerspaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom der Kette kann nur das Fragment mit der Methoxygruppe die positive Ladung tragen. Dieser Peak ist somit nur erklärbar, wenn das Alditolacetat end-

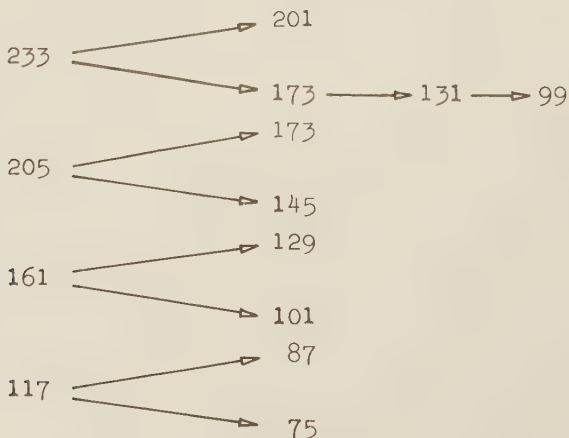
ständig zwei benachbarte, methoxylierte Kohlenstoffatome besitzt. Diese Voraussetzung trafe für das Methylalditolacetat der verzweigtkettigen Pentofuranose Apiose zu:



1,4-Di-O-acetyl-2,3,3'-tri-O-methylapitol
(MG 278)

T a b e l l e 2

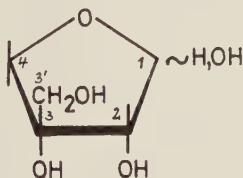
Primärfragmente m/e	Sekundärfragmente m/e durch Abspaltung von Essigsäure (m/e = 60), Keten (m/e = 42), Methanol {m/e = 32} oder Form- aldehyd {m/e = 30}
---------------------	---



Der Vergleich unseres Alditolacetates mit einer authentischen Probe von 1,4-Di-O-acetyl-2,3,3'-tri-O-methylapitol aus *Daviesia latifolia* ⁵³⁾ durch LINDBERG u. SVENSSON zeigte in der Tat sowohl gaschromatographisch als auch massenspektrometrisch vollkommene Übereinstimmung.

Das angegebene Fragmentierungsschema wurde durch das Massenspektrum einer Probe, die ein Deuteriumatom an C-1 enthielt, bestätigt: Das Fragmention m/e 205 wurde beim Acetylmethylapitol teilweise nach 206 verschoben. Diese Verschiebung trat bei C-1 markierten Methylalditolacetaten von nicht verzweigten Pentofuranosen, welche ein 1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methylpentitol liefern, nicht auf.

Der Zucker von Frangulin B müßte somit eine Apiofuranose sein:



Dieses Ergebnis erklärt nachträglich den geringen Verbrauch an Perjodat für eine Pentose bei der Perjodsäureoxidation und die Schwierigkeiten bei der PC- und DC-Detektion bei üblicher Konzentration des Zuckers. Auch PATRICK ⁵⁴⁾ berichtete von einer nur schwach gelb-braunen Färbung mit Anilinchthalat.

Das Auftreten von 3 Flecken bei der Dünnschichtchromatographie des Frangulin-B-Zuckers ist für Apiose auch von anderer Seite beobachtet worden. SANDERMANN u. GRISEBACH ⁵⁵⁾ nehmen an, daß es sich hierbei um stereoisomere Formen handelt.

9. Spektralphotometrische Bestimmung der D-Apiose

SANDERMANN⁵⁶⁾ benützt einen modifizierten Dische-Test als spezifische und rasche Nachweismethode für D-Apiose. Mit der Zuckerlösung werden die in Tabelle 3 angegebenen Reaktionen durchgeführt und die Extinktionen bei den Wellenlängen der angegebenen Absorptionsmaxima und bei $\lambda = 500$ nm gemessen. Daraus errechnet man die molaren Extinktionskoeffizienten.

Rhamnose besitzt ebenfalls nahe 463 nm (Bestimmung C) maximale Absorption. Die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{463} - \epsilon_{500}$) ist aber für beide Zucker sehr unterschiedlich.

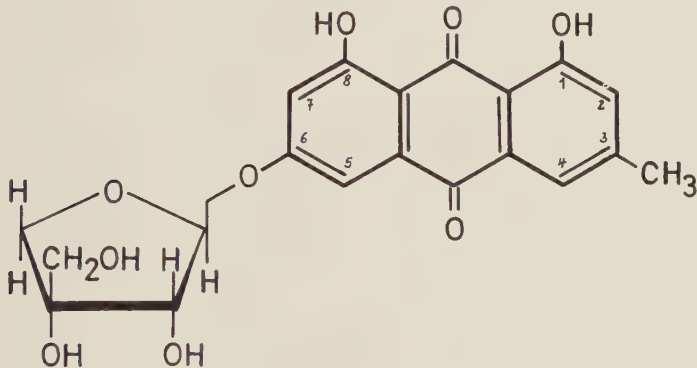
Nach der Hydrolyse von Frangulin B und Abtrennung des Aglykons führten wir mit der wäßrigen Zuckerlösung die in Tabelle 3 angegebenen Bestimmungen durch. Bei den molaren Extinktionswerten sind in Klammern die von SANDERMANN erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

T a b e l l e 3

Bestimmung	Reaktion von	Absorptionsmaximum (nm)	Molarer Extinktionswert ($\text{mol}^{-1} \text{ cm}^2$)
A	Apiose + H_2SO_4	276.4	$\epsilon_{276.5}$ $8.2 \cdot 10^3$ ($8.0 \cdot 10^3$)
B	Apiose + Fructose + H_2SO_4	449	($\epsilon_{449} - \epsilon_{500}$) $14.2 \cdot 10^3$ ($14.1 \cdot 10^3$)
C	Apiose + Fructose + H_2SO_4 + Cystein	463	($\epsilon_{463} - \epsilon_{500}$) $21.9 \cdot 10^3$ ($24.0 \cdot 10^3$)

Die Absorptionsmaxima lagen exakt bei den Wellenlängen, die von SANDERMANN ⁵⁶⁾ angegeben wurden. Allerdings soll die Differenz ($\epsilon_{463} - \epsilon_{500}$) für Apiose bei Bestimmung C $24.0 \cdot 10^3$ betragen, während sich bei uns ein etwas niedrigerer molarer Extinktionswert errechnete.

Aus allen diesen Untersuchungsergebnissen ergibt sich für das Frangulin B die Struktur eines 6-O-(D-Apiofuranosyl)-1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinons:



Damit ist Apiose erstmals als Bestandteil von Anthrachinonglykosiden und in der Rhamnaceen-Familie nachgewiesen worden.

Der im Flavonglykosid Apiin aus Petersilie von VONGERICHTEN ⁵⁷⁾ entdeckte und aufgeklärte verzweigt-kettige Zucker kommt noch in einigen Polysacchariden der Zellwände von Wasserpflanzen und nur in 8 bisher bekannten Glykosiden vor ⁵⁸⁾ ⁵⁹⁾. Bemerkenswert ist noch, daß Apiose bisher ausschließlich bei Disaccharidglykosiden und zwar als Apiosylglucosid aufgetreten ist.

B. Isolierung und Beiträge zur Struktur von zwei weiteren Anthrachinonglucosiden aus der Rinde von Rhamnus frangula L. (Faulbaumrinde)

Da HÖRHAMMER u. Mitarb. 7) 60) auf Grund chromatographischer Studien in Cortex Frangulae ein Emodinglucosid vermuteten und auch MÜHLEMANN u. LYK 15) durch DC-Vergleiche eines Extraktes aus Frangularinde mit dem von MÜHLEMANN 61) synthetisierten Emodin-1-O- oder -8-O-glucosid diese Vermutung bestätigen konnten, versuchten wir, dieses Glucosid zu isolieren und chemisch in seiner Struktur festzulegen.

1. Isolierung

Wir isolierten die fragliche Substanz aus Frangoselect (Fa. Invernì della Beffa, Mailand), einem mit Anthraglykosiden angereicherten und etwas vorgereinigten Frangula-Extrakt, über eine Kieselgelsäule mit Äthylacetat-Methanol-Wasser als Elutionsmittel. Aglykone und Franguline liefen als gelbe Zonen voraus. Die nachfolgende orangerot gefärbte Zone entsprach chromatographisch dem beschriebenen Emodinglucosid. Nach den dunkelgelb erscheinenden Glucofrangulinen trennte sich nochmals eine zweite orangerot gefärbte Zone ab, die wir ebenfalls untersuchten. Die beiden Glykoside I und II hatten auf Kieselgel bzw. Polyamid die in Abb. 10 angegebenen R_F -Werte.

2. Glykosid I

Die schwefelsaure Hydrolyse von Glykosid I lieferte eindeutig Emodin. Der Schmelzpunkt des isolierten Aglykons betrug 254 - 256°C und stimmte mit der Literaturangabe überein.

Der einzig nachweisbare Zucker war Glucose.

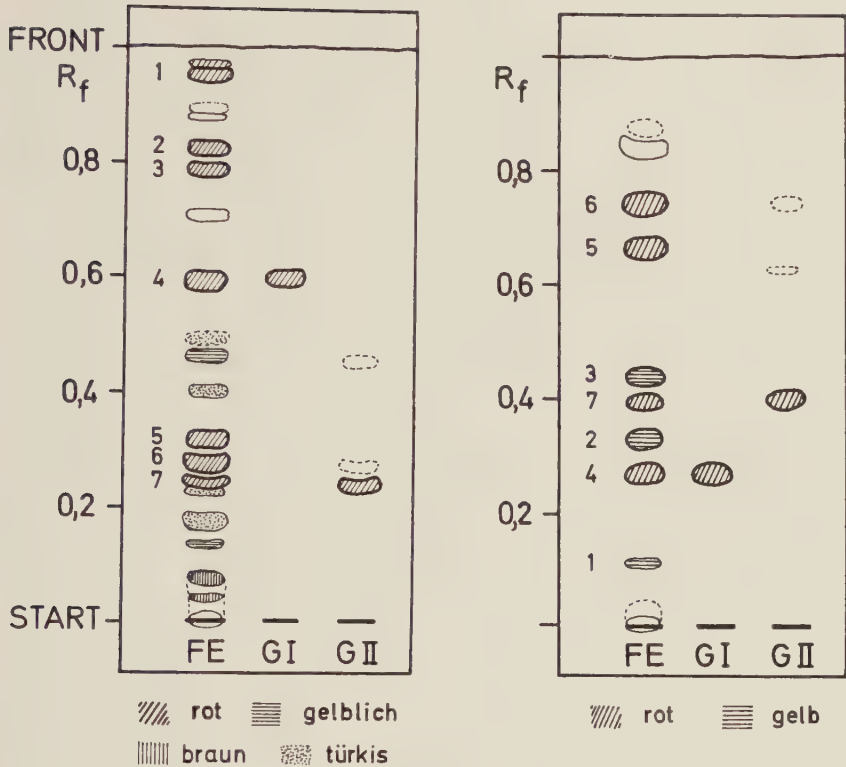


Abb. 10

Dünnschichtchromatographie des Frangula-Extraktes und der isolierten Verbindungen

DC-Kieselgelkarte SIF
(Riedel-de Haën)

Polyamid

Äthylacetat-Methanol-Wasser
(100:17:13)

Methanol

methanol. Kalilauge/UV 360 nm

UV 360 nm

FE = Frangula-Extrakt
G I = isoliertes Glykosid I (Emodinglucosid)
G II = isoliertes Glykosid II

1 = Aglykone
(Emodin, Chrysophanol)
2 = Frangulin B
3 = Frangulin A
4 = Emodin-8-0-glucosid

5 = Glucofrangulin B
6 = Glucofrangulin A
7 = Emodin-1-0- oder
-8-0-diglucosid

Da das Glykosid I im DC gleiche Laufhöhe wie das Rheumemodin-1-0- oder -8-0-mono-glucosid aus Rheum palmatum ⁶²⁾ hatte, konnte es sich nur um ein Monoglucosid handeln, wobei für die Glucoseverknüpfung die 1-, 6- oder 8-Stellung in Frage kamen.

Eine gewisse Differenzierung war nach BRIGGS, NICHOLLS u. PATERSON ⁶³⁾ auf UV-spektrophotometrischem Wege möglich:

Anthrachinone, die zwei freie Hydroxylgruppen in α -Stellung zur Carbonylgruppe tragen, zeigen im Absorptionsspektrum zwischen 427 - 432 nm ein Maximum, während bei nur einer freien Hydroxylgruppe das Maximum nach 407 - 413 nm, bei zwei substituierten α -ständigen OH-Gruppen nach 356 - 362 nm hypsochrom verschoben wird. Das Glykosid I hatte sein Maximum bei 414 nm, so daß der zweite Bindungstyp vorliegen müßte.

Die Aufnahme des Spektrums im alkalischen Medium konnte als zusätzliche Bestätigung für die Verknüpfungsstelle der Glucose herangezogen werden. In einer physikalisch-chemischen Betrachtung über die Bornträger-Reaktion geben AUTERHOFF u. BOEHME ⁶⁴⁾ an, daß bei 1,8-Dihydroxy-anthrachinonen mit freien α -ständigen Hydroxylen das Absorptionsmaximum durch Alkalien von 430 nach 520 nm, mit 1- oder 8-blockiertem phenolischem Hydroxyl von 410 nach 490 nm verschoben wird. Von Glykosid I wurde das Maximum nach 487 nm verschoben.

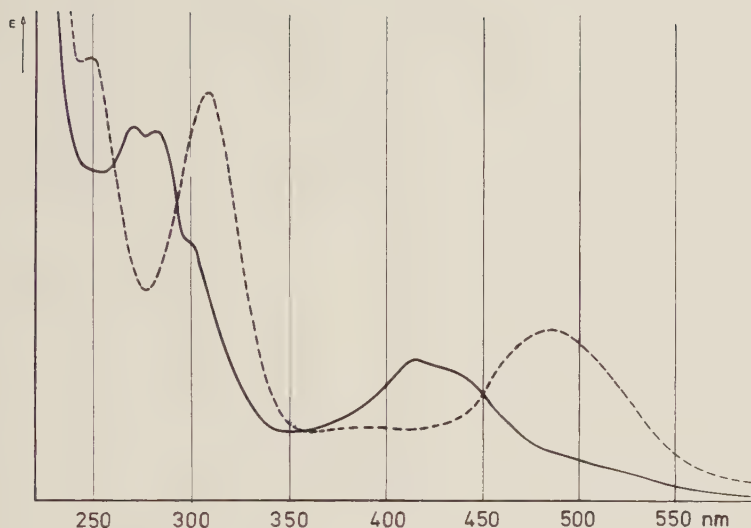


Abb. 11

Absorptionsspektrum von Glykosid I
in Methanol (—) und Methanol/NaOH (-----)

Somit ist Glykosid I ein Emodin-1-O- oder -8-O-mono-glucosid. Der Schmelzpunkt der gelben, kleinkristallinen Büschel liegt bei 202 - 203°C. MÜHLEMANN⁶¹⁾ gab für sein synthetisiertes, kristallines Emodin-1-O- oder -8-O-glucosid 193.5 - 195°C an und erwähnt hierzu, daß die Substanz nicht vollständig rein vorgelegen hat.

Alle bisher bekannten, natürlich vorkommenden Glykoside der 1,8-Dihydroxy-anthrachinon- und -anthron-Reihe in Anthradrogen liegen als 8-O-Glykoside vor, wie Chrysophanol-⁶⁵⁾, Aloeemodin-8-O-β-D-glucosid⁶⁶⁾, Glucofrangulin A¹³⁾, Sen-

nosid A und B ⁶⁷⁾ und Cascarosid A und B (siehe S. 52). Außerdem konnten STEGLICH u. LÖSEL ⁶⁸⁾ ⁶⁹⁾ beweisen, daß im Gegensatz zu einem Anthrachinon-Pilzpigment das Emodinglucosid aus höheren Pflanzen die Struktur eines Emodin-8-O- β -D-glucopyranosids besitzt.

Somit darf angenommen werden, daß unser aus *Rhamnus frangula* isoliertes Glucosid ebenfalls ein Emodin-8-O- β -D-glucopyranosid darstellt.

3. Glykosid II

Die Hydrolyse und die Überprüfung der Hydrolyseprodukte führten wir wie bei Glykosid I durch.

Die Chromatographie der Ätherausschüttelung zeigte neben Emodin als Hauptfleck noch in schwacher Konzentration Chrysophanol als Verunreinigung.

Die Chromatographie des Zuckeranteils in zwei verschiedenen Laufmitteln ergab nach dem Besprühen mit Anilinphthalat einen kräftig braun gefärbten Fleck in Höhe der Glucose. Ein bei 360 nm sehr schwach bläulichbraun fluoreszierender Fleck mit dem R_f -Wert der Rhamnose dürfte wohl durch eine geringe Verunreinigung des Glykosids II mit Glucofrangulin A bedingt sein.

Der R_f -Wert von Glykosid II entspricht, verglichen mit den Glucofrangulinen, einem Diglykosid. Die Interpretation des UV-Spektrums nach BRIGGS u. Mitarb. ⁶³⁾ und AUTERHOFF u. BOEHME ⁶⁴⁾, sowie die Ergebnisse der Hydrolyse und die Absorption zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} im IR-Spektrum lassen die Vermutung zu, daß es sich bei Glykosid II um ein Emodin-1-O- oder -8-O-glucosylglucosid handeln könnte. Bei diesem Glucosid dürfte ebenfalls, wie beim Monoglucosid begründet, die 8-O-Verknüpfung vorliegen.

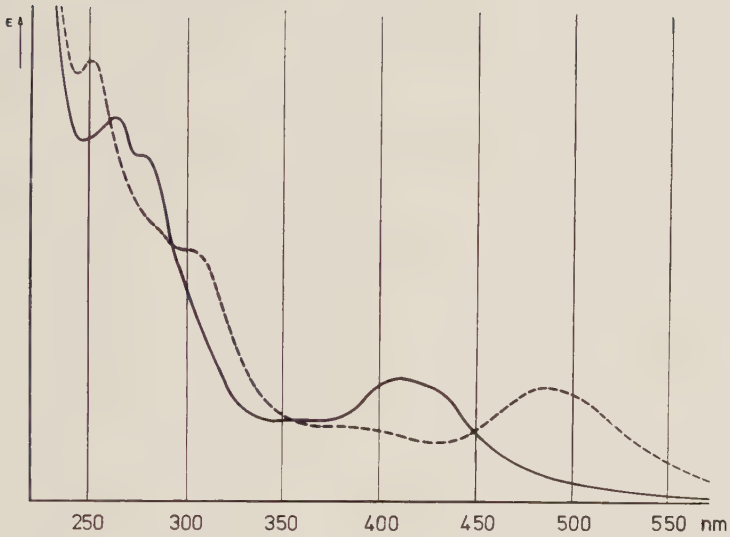


Abb. 12

Absorptionsspektrum von Glykosid II
in Methanol (—) und Methanol/NaOH (----)

Glykosid II ist dunkelrotbraun gefärbt und schmilzt im Bereich von 170 - 176°C.

C. Reindarstellung von Cascarosid A und B aus der Rinde von Rhamnus purshianus DC. (amerikanische Faulbaumrinde) und Beiträge zur endgültigen Strukturaufklärung

I. Bisherige Arbeiten über die Inhaltsstoffe von Cortex Cascarae sagradae (= Cortex Rhamni purshiani)

Eine Literaturübersicht über die bis 1961 aus der amerikanischen Faulbaumrinde isolierten Inhaltsstoffe findet sich bei BAUMGARTNER u. LEUPIN ⁷⁰⁾. Die Liste enthält Aloeemodin, Emodin und Chrysophanol sowie deren Glucoside ^{24) 71) 72)}, Emodinoxanthronglucosid und die von TSUKIDA u. SUZUKI ⁷¹⁾ nachgewiesenen Anthrone. KINGET ⁷³⁾ berichtete 1967 über die Isolierung verschiedener Homo- und Heterodianthrone.

Bemerkenswert war das Auftreten von Glykosiden, die sich zum Teil wie das Aloin der Aloe nur unter stärkeren Bedingungen hydrolysieren ließen. Deshalb vermuteten LIDDEL u. Mitarb. ⁷⁴⁾ in ihnen aloinähnlich gebaute Verbindungen. BAUMGARTNER u. LEUPIN ^{70) 75)} gelang es dann, zwei Verbindungen über die Acetate rein darzustellen und sie als das C-glucosidisch verknüpfte Aloin und 11-Desoxyaloin zu identifizieren.

FAIRBAIRN u. MITAL ⁷⁶⁾ berichteten 1957 erstmals über eine aloinähnliche, aber gut wasserlösliche Substanz, aus der sie durch salzsaure oxidative Hydrolyse mit Eisen-III-chlorid Aloeemodin und Chrysophanol erhielten. In weiteren Versuchen ⁷⁷⁾ zeigte sich aber, daß diese Verbindung papierchromatographisch in 4 nahe verwandte Anthraderivate aufgetrennt werden konnte. Zwei davon, Cascarosid A und B, wurden mit Hilfe der Gegenstromverteilung isoliert. Sie ergaben bei milder Hydrolyse Aloin und bei oxidativer Spaltung mit Eisen-III-chlorid Aloeemodin. Ein wesentlicher Unterschied beider Verbindungen war die optische Drehung.

Versuche mit den nur als Gemisch erhaltenen Cascarosiden C und D ⁷⁸⁾ ergaben, daß Derivate des Desoxyaloins oder "Chrysoaloin" vorlagen, die bei der oxidativen Hydrolyse Chryso-
phanol als einziges Aglykon lieferten.

FAIRBAIRN u. Mitarb. ⁷⁹⁾ vermuteten in den Cascarosiden A und B stereoisomere Verbindungen, da sie bei der Acetylierung aus beiden Glykosiden ein Anthranolacetat mit gleicher optischer Drehung und gleichem Schmelzpunkt erhalten hatten. Bei der Bildung des Anthranolacetates mußte demnach das Isomeriezentrum am C-10 des Aloeemodinanthrone aufgehoben worden sein. Es gelang den Autoren auch, durch Hydrolyse aus Cascarosid A ein (+)-Aloin und aus Cascarosid B ein (-)-Aloin zu erhalten. Dabei wurden Glucose und eine zweite, nicht reduzierende Komponente abgespalten, die ein kleineres Molekulargewicht als Glucose aufwies. Bezüglich der Verknüpfung der Zucker am Aloin stellten FAIRBAIRN u. Mitarb. zwei Möglichkeiten zur Diskussion: Beide Zucker sind als Disaccharid an eine phenolische Gruppe des Aloins geknüpft oder beide Zucker sind getrennt an eine phenolische und eine alkoholische Gruppe des Aloins gebunden.

Im folgenden haben wir versucht, die Struktur der Cascaroside endgültig zu klären.

II. Eigene Arbeiten zur Aufklärung der Zuckerverknüpfung bei den Cascarosiden

1. Isolierung der Cascaroside A und B

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir einen Cascara-Extrakt (siehe Abb. 13) der Milanfarma, Mailand. Dieser äthanolische Extrakt war durch Fällung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln von einem Teil der Gerb- und Begleitstoffe befreit und enthielt die Cascaroside in schwach angereicherter Form.

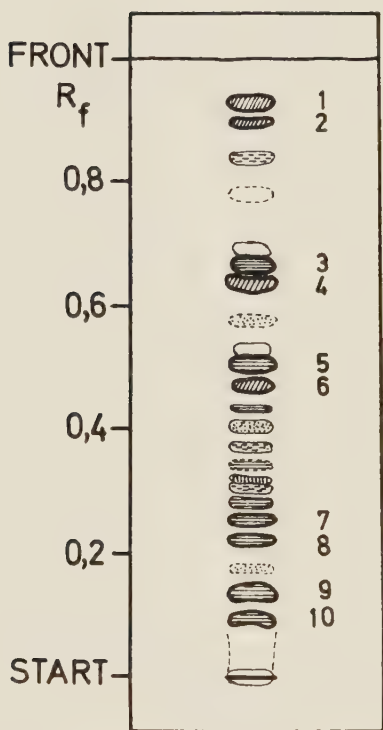


Abb. 13

Dünnschichtchromatographie
des Cascara-Extraktes

Kieselgelkarten SIF
(Riedel-de Haën)

Äthylacetat-Methanol-Wasser
(100:17:13)

methanol. KOH / UV 360 nm

 rot	 gelb
 blau	 braun
 türkis	

1 = Chrysophanol, Emodin
2 = Aloeemodin
3 = 11-Desoxyaloin
4 = Emodin-8-O-glucosid
5 = Aloin

6 = Aloeemodin-8-O-glucosid
7 = Cascarosid C
8 = Cascarosid D
9 = Cascarosid A
10 = Cascarosid B

Trennungsversuche mit verschiedenen Adsorbentien und Elu-
tionsmitteln ergaben, daß die günstigste Trennung bzw. beste
Anreicherung an Polyamid und mit Wasser als Eluans zu erzie-
len ist.

Durch Gefriertrocknung der wäßrigen Fraktionen erhielten wir
hellgelb gefärbte Substanzen, die gereinigte Gemische aus
Cascarosiden, Aloin und Desoxyaloin unterschiedlicher Kon-

zentration darstellten. Eine Auftrennung dieser Substanzen über eine zweite Polyamid- oder eine Cellulosesäule brachte kein brauchbares Ergebnis. Da sich die Cascaroside auf Papier mit Äthylacetat-Methanol-Wasser als Laufmittel in einer Entwicklungszeit von mindestens 15 Stunden gut voneinander abtrennten, versuchten wir die präparative Papierchromatographie. Wir erhielten auf diese Weise gelbe, amorphe Reinsubstanzen. Kristallisationsversuche verliefen negativ.

Das Cascarosid mit dem höheren R_f -Wert schmolz unter Braunfärbung im Bereich von $184 - 187^{\circ}\text{C}$, das Cascarosid mit dem niedrigeren R_f -Wert bei $175 - 178^{\circ}\text{C}$. Die von FAIRBAIRN ⁷⁷⁾ angegebenen Schmelzbereiche liegen durchschnittlich 10°C darunter. Die Maxima der UV-Spektren unserer isolierten Cascaroside stimmten mit den angegebenen Werten überein. Da auch die optischen Drehwerte mit denen von FAIRBAIRN annähernd übereinstimmten, war kein Zweifel, daß es sich bei diesen Verbindungen um die erstmals von FAIRBAIRN isolierten Cascaroside A (höherer R_f) und B (niedrigerer R_f) handelte.

Die IR-Spektren der Cascaroside A und B (Abb. 14, 15) unterscheiden sich nicht wesentlich und besitzen Ähnlichkeit mit dem des Aloins.

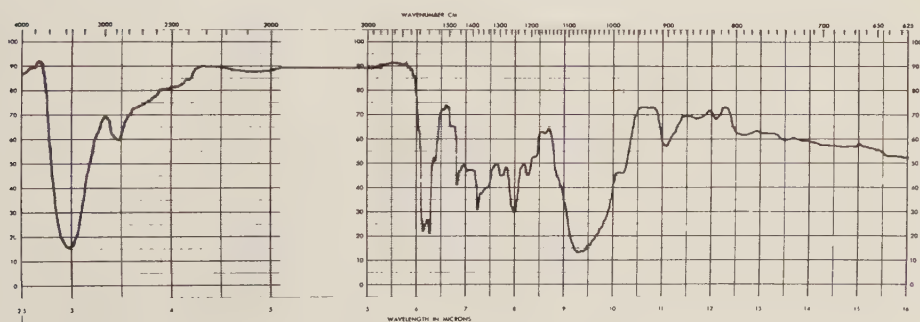


Abb. 14

IR-Spektrum von Cascarosid A

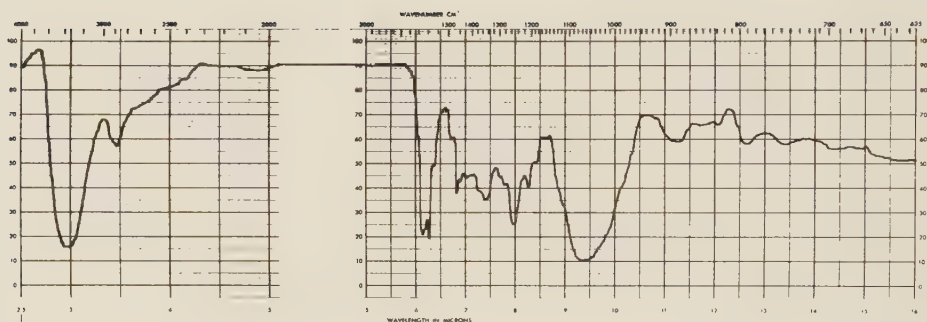


Abb. 15

IR-Spektrum von Cascarosid B

Aus den nachfolgenden Fraktionen der Polyamid-Säulentrennung, welche die Cascaroside C und D angereichert enthielten, konnten wir papierchromatographisch auch geringe Mengen dieser beiden Cascaroside isolieren.

Die für Cascarosid A und B in Pyridin ermittelten Molekulargewichte von 561.5 bzw. 532.5 deuteten darauf hin, daß nur ein weiterer Zucker mit dem Aloin verknüpft sein kann und daß die von FAIRBAIRN geäußerte Vermutung über zwei O-gebundene Zucker in den Cascarosiden irreal ist.

Eine nachträglich durchgeführte Wassergehaltsbestimmung ergab pro Mol Cascarosid A oder B jeweils 2 H₂O und erklärt somit die zu niedrigen Werte für das MG.

2. Hydrolysen

a) Saure Hydrolysen

Die Hydrolyse beider Cascaroside und von Aloin mit 5%iger Salzsäure lieferte bei allen drei Verbindungen als Anthrachinonanteil vorwiegend Aloeemodin. Bei den Cascarosiden war

Aloin nur in sehr geringer Menge entstanden.

Bei den Hydrolysen mit 0.1N Schwefelsäure dagegen (20 Min. bei 100°C oder 3 Stdn. bei 70°C, einige Versuche unter Stickstoffatmosphäre) wurde aus den Cascarosiden fast nur Aloin abgespalten. Es stimmte dünnschicht- und papierchromatographisch mit dem Aloin-Test vollkommen überein. Auch die UV-Spektren entsprachen eindeutig dem Aloin-Spektrum.

Einen weiteren Hinweis auf die Anthrongrundstruktur der Cascaroside brachte das Anfärben mit spezifischen Sprühreagentien: Echtblausalz färbte die Cascaroside dunkelgrün bis blaugrün, p-Nitroso-N,N-dimethyl-anilin bräunlich - grau bzw. nach längerem Liegen grünlichgelb an. Diese Färbungen sind für reduzierte Anthrachinone typisch.

In der wäßrigen Phase der sauren Cascarosid-A,B-Hydrolyse war papierchromatographisch in 2 verschiedenen Laufmitteln eindeutig nur Glucose nachzuweisen. Bei der oxidativen Spaltung mit Eisen-III-chlorid war dagegen neben Glucose auch Arabinose nachweisbar. Die Bildung von Arabinose aus Glucose unter oxidativen Bedingungen ist nach RUFF erklärbar.

b) Enzymatische Hydrolysen

Nach 5tägiger Inkubation von Cascarosid A, Cascarosid B und Aloin mit Emulsin und β -Glucosidase bei 35°C hatte sich ein Niederschlag gebildet, der dünnschicht- und papierchromatographisch eindeutig als Aloeemodin identifiziert werden konnte. Somit wurden die reduzierten Verbindungen auch bei der enzymatischen Hydrolyse teilweise oxidativ gespalten. Unter Naringinase-Einwirkung war nur in Spuren ein Niederschlag entstanden.

Die Äthylacetatausschüttelungen der Filtrate und die wäßrigen Phasen wurden ebenfalls chromatographisch untersucht (siehe Abb. 16).

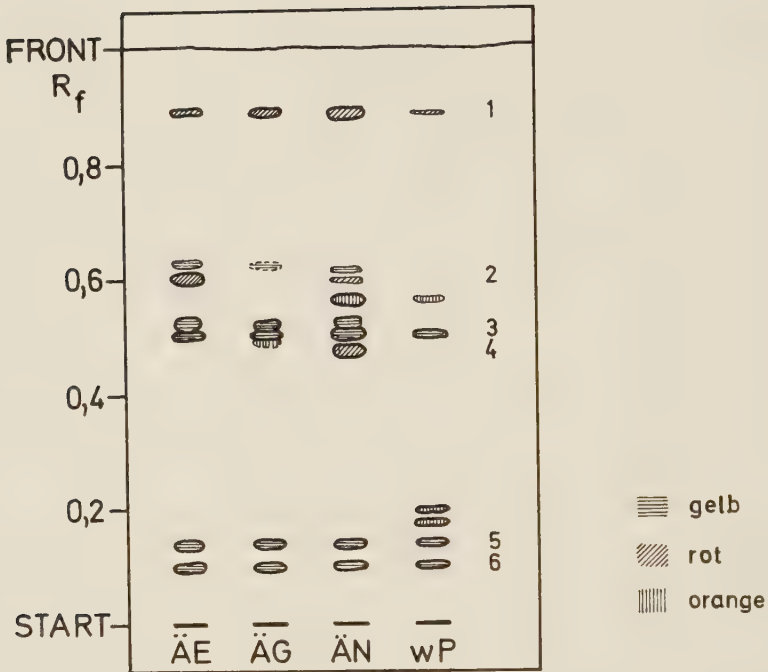


Abb. 16

Dünnschichtchromatographie der Äthylacetatausschüttelungen und der wäßrigen Phase der enzymatischen Hydrolysen

Kieselgel HF

Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

methanol. Kalilauge / UV 360 nm

Äthylacetatausschüttelungen der Hydrolyse mit Emulsin (ÄE),
β-Glucosidase (ÄG) und Naringinase (ÄN)

ÄE, ÄG und ÄN bei Cascarosid A und B gleich

wP = wäßrige Phase (bei allen Spaltungen gleich)

1 = Aloeemodin

2 = Rhein

3 = Aloin

4 = Aloeemodin-8-O-glucosid

5 = Cascarosid A

6 = Cascarosid B

Dabei zeigte sich vorwiegend in den Äthylacetat-Phasen etwas oberhalb des Test-Aloins ein zweiter Fleck, der schon vor dem Besprühen mit methanolischer Kalilauge gelbe Fluoreszenz zeigte.

Die Vermutung, daß es sich hierbei um ein isomeres Aloin handeln könnte, bestätigte sich nicht. Mit den oben erwähnten Anthron-Sprühareagentien gab diese Substanz keine deutliche, charakteristische Färbung und auch eine spätere massenspektrometrische Untersuchung ergab in der Fragmentierung keine Übereinstimmung oder Verwandtschaft mit Aloin.

Die Äthylacetatausschüttelung der Naringinase-Hydrolyse zeigte zusätzlich einen roten Fleck in Höhe von authentischem Aloeemodulinglucosid. Die Identität konnte später durch Isolierung sichergestellt werden.

Interessanterweise war bei der Emulsin-Spaltung eine teilweise Oxidation des Aloeemodins bis zum Rhein erfolgt.

Die Chromatographie der wäßrigen Phase zeigte, daß die enzymatischen Hydrolysen nicht quantitativ verlaufen waren. In den Ansätzen waren die Cascaroside noch vorhanden und in der Cascarosid-A-Lösung war nun zusätzlich die B-Verbindung nachweisbar und umgekehrt.

Durch die Hydrolyseversuche wurde bewiesen, daß die Cascaroside A und B je nach den gewählten Versuchsbedingungen in Aloeemodin, Aloin, Glucose und zwei weitere Anthraglykoside aufspalten.

3. Quantitative spektralphotometrische Bestimmungen

Nachdem bereits die Molekulargewichtsbestimmung der Cascaroside auf ein Aloinmonoglykosid hingewiesen hatte, führten wir eine quantitative Bestimmung von Aglucon- und Glucoseanteil durch:

Wir spalteten die Cascaroside mit 5%iger HCl unter FeCl_3 -Zusatz und bestimmten das gebildete Aloeemodin in Anlehnung an die spektralphotometrische Methode von SCHRATZ u. VET-HACKE⁸⁰⁾. Der Berechnung legten wir die mit Aloin im Parallelversuch erhaltenen Bezugswerte zugrunde.

Die Bestimmung ergab für Cascarosid A berechnet als Aloeemodinanthron einen Mittelwert von 42.1%, für Cascarosid B einen von 42.9%. Der theoretische Wert für ein Aloinmonoglykosid liegt bei 44.2%.

Den Glucoseanteil bestimmten wir nach der von MALLOV⁸¹⁾ modifizierten DREYWOOD-Anthron-Methode^{82) 83)}. Dabei war es gleichgültig, ob die Farbreaktion mit den unhydrolysierten Glykosiden oder nach deren Hydrolyse durchgeführt wurde. Infolge der schwereren Spaltbarkeit der C-C-verknüpften Glucose erhitzten wir zur Entwicklung der Farbreaktion 20 Min. im siedenden Wasserbad. Eine Parallel-Bestimmung erfolgte mit Aloin.

Wir ermittelten für Cascarosid A insgesamt 1.89 Mol und für Cascarosid B 1.85 Mol Glucose.

Damit ist die Annahme, daß es sich bei den Cascarosiden um Aloeemodinanthrondiglucoside handelt, d.h. um Aloine mit einem O-gebundenen Mol Glucose, eindeutig bestätigt.

4. Acetylierung der Cascaroside

Die für Aloin geeignete Acetylierungsmethode mit Essigsäureanhydrid und Zinkchlorid nach GERECS⁸⁴⁾ war für die Cascaroside nicht anwendbar: Nach Acetylierung, säulenchromatographischer Auftrennung und NMR-Spektroskopie zeigte sich, daß unter den schwach sauren Bedingungen eine Hydrolyse stattgefunden hatte. Es entstanden aus den Cascarosiden

Aloinheptaacetat und α -, β -Glucosepentaacetat.

Bei der Acetylierung mit Pyridin und Essigsäureanhydrid bildeten sowohl Aloin als auch die Cascaroside gelbliche Acetylierungsprodukte, die in Lösung intensive Fluoreszenz zeigten. Dieses Verhalten spricht nach MÜHLEMANN⁸⁵⁾ für Anthranolformen, die am Anthranolhydroxyl alkyliert oder acyliert sind. Im IR-Spektrum trat auch bei unseren Acetaten keine Carbonylbande auf.

Im übrigen deutete die Zahl von annähernd 11 Acetylgruppen im NMR-Spektrum der Cascarosidacetate ebenfalls auf die Anthranolform hin und bestätigte das Vorliegen von nur 2 Hexoseeinheiten. Unklar war das Auftreten eines Dubletts bei $\delta = 1.3$ (integriert für 3 Protonen) sowie die paramagnetische Verschiebung von Zuckerprotonen nach $\delta \sim 5.9$. Diese Signale lassen eine Öffnung bzw. Veränderung der C-C-verknüpften Glucoseeinheit vermuten.

5. NMR-Spektroskopie der Cascaroside

Die in Methanol aufgenommenen NMR-Spektren der Cascaroside A und B unterscheiden sich nicht wesentlich. Das in beiden Fällen bei $\delta = 4.93$ auftretende Dublett läßt sich dem CH-1' der O-verknüpften Glucose zuordnen und beweist mit einer Kopplungskonstanten von 8 Hz die β -Verknüpfung einer Glucopyranose.

In DMSO zeigen dagegen die beiden Cascaroside ein unterschiedliches kernmagnetisches Verhalten, und zwar im Aromatenbereich bei $\delta = 6.7 - 7.7$ und im Bereich der phenolischen OH-Gruppen ($\delta = 11.8 - 12.1$).

Bei Cascarosid A (Abb. 18) sind die beiden Singuletts bei $\delta = 6.83$ und $\delta = 6.98$ den Aromatenprotonen H-2 bzw. H-4 (siehe Abb. 17) zuzuordnen. Das für 2 Protonen integrierte Multiplett bei $\delta = 7.27$ stammt von H-5 und H-7. H-6 er-

scheint als Triplett bei $\delta = 7.59$ mit der Kopplungskonstanten von 8 Hz. Das für phenolische OH-Gruppen verantwortliche Signal liegt bei $\delta = 11.82$ und integriert für 1 Proton.

Cascarosid B (Abb. 19) ergibt entsprechende Signale, die allerdings eine geringe chemische Verschiebung im Vergleich zu Cascarosid A aufweisen: Die Aromatenprotonen sind zum höheren Feld verschoben und zwar erscheinen H-2 bei $\delta = 6.76$, H-4 bei $\delta = 6.91$, H-5 und H-7 bei $\delta = 7.22$ und H-6 bei $\delta = 7.53$. Das von der phenolischen OH-Gruppe stammende Signal ist dagegen zum tieferen Feld nach $\delta = 12.05$ verschoben und integriert ebenfalls für 1 Proton.

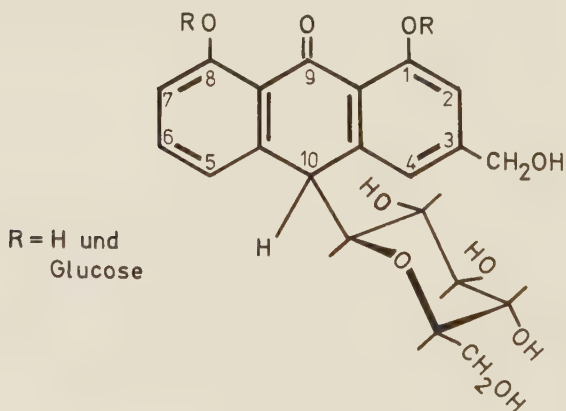


Abb. 17

Übersichtsformel der Cascaroside A und B

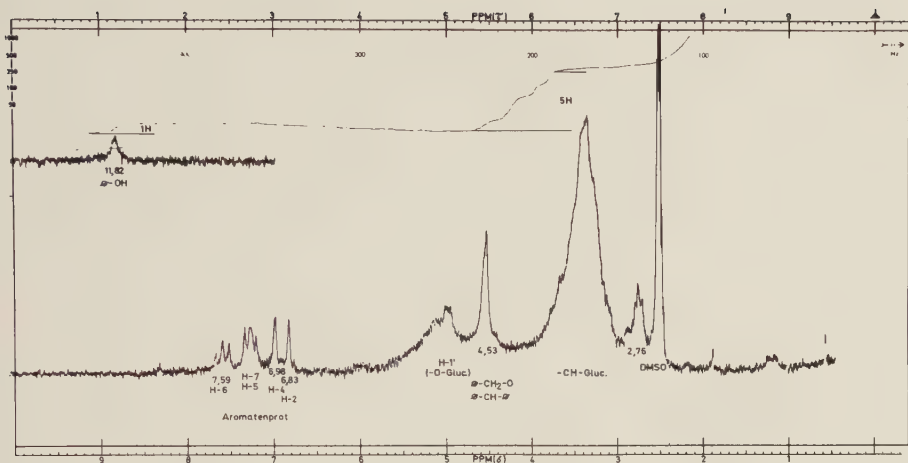


Abb. 18

NMR-Spektrum von Cascarosid A in DMSO
(aufgenommen sofort nach Herstellung der Lösung)

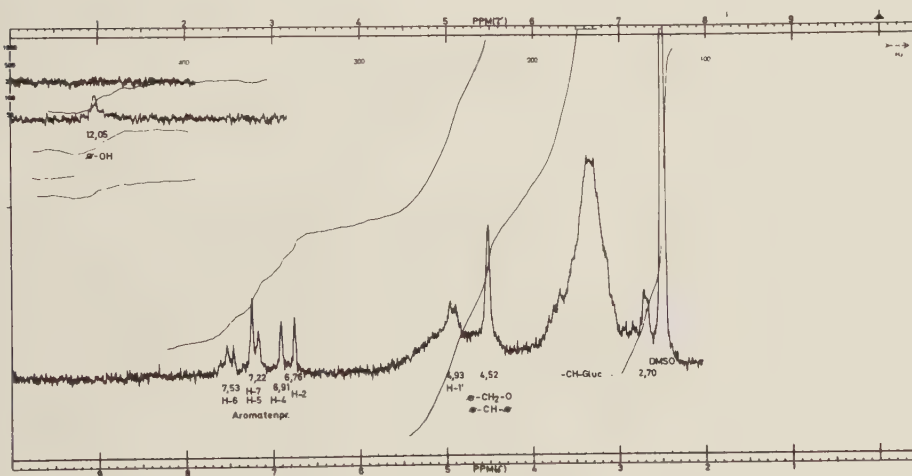


Abb. 19

NMR-Spektrum von Cascarosid B in DMSO
(aufgenommen sofort nach Herstellung der Lösung)

Daß in DMSO eine wechselseitige Gleichgewichtseinstellung beider Cascaroside stattgefunden hatte, konnte auch papierchromatographisch bestätigt werden. Außerdem war unter diesen Bedingungen gleichzeitig eine geringfügige Spaltung in Aloeemodingleucosid erfolgt.

6. Spaltung von Cascarosid A und B zu Aloeemodin-8-O- β -D-glucosid

Die in DMSO beobachtete Cascarosid-Umwandlung unter gleichzeitiger Dunkelrotfärbung der Lösung trat in Pyridin beschleunigt auf. Außerdem wurde das fragliche Aloeemodingleucosid in Pyridin in wesentlich höherer Konzentration gebildet. Um den Nachweis zu erbringen, daß sich tatsächlich Aloeemodin-8-O-glucosid gebildet hatte, isolierten wir die Verbindung durch präparative Papierchromatographie und verglichen sie mit authentischem Aloeemodin-8-O- β -D-mono-glucosid ⁶⁶⁾.

Der Schmelzpunkt von 237°C entsprach dem angegebenen Wert in der Literatur.

Unsere isolierte Substanz zeigte das für Anthrachinon-1-O- oder -8-O-glykoside charakteristische Maximum bei 410 nm. Durch Natronlaugezusatz wurde das Maximum nach 490 nm verschoben.

Die auf Kieselgel, Polyamid und Papier durchgeführte Chromatographie in verschiedenen Laufmitteln ergab vollkommene R_f -Wert-Übereinstimmung mit dem Test.

Die Spektren von isoliertem und authentischem Aloeemodin-8-O- β -D-monoglucosid waren deckungsgleich (Abb. 21).

Auch Aloin verändert sich in Pyridinlösung und geht, allerdings erst nach 2 Stdn., in Aloeemodin über.

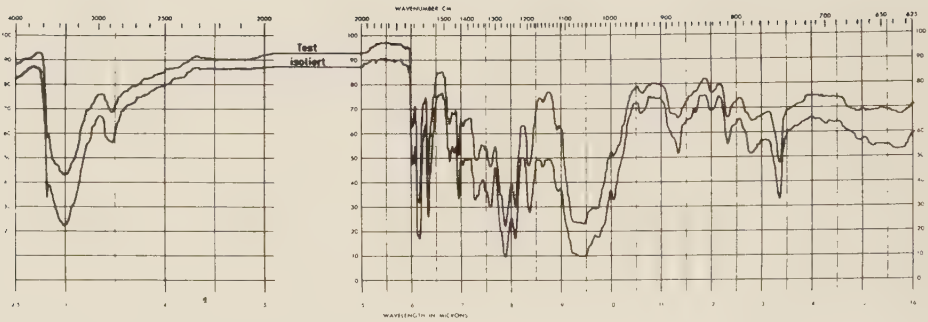


Abb. 21

IR-Spektren des authentischen und isolierten Aloeemodin-8-O- β-D-monoglucosids

Mit der Identifizierung von Aloeemodin-8-O-β-D-monoglucosid als Hauptspaltprodukt von Cascarosid A und B ist gleichzeitig die Zuckerstellung der O-gebundenen Glucose bewiesen. Man kann hiernach die beiden Cascaroside als 8-O-(β-D-Glucopyranosyl)-, 10-C-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-hydroxy-methyl-9-anthrone oder 8-O-β-D-Glucopyranosyl-aloine bezeichnen.

7. Optische Drehung und Circular-Dichroismus der Cascaroside A und B

FAIRBAIRN u. Mitarb. ⁷⁷⁾ haben für die von ihnen isolierten Cascaroside A und B neben einer Schmelzpunktdifferenz auch eine unterschiedliche optische Drehung gefunden. Der in Äthanol bestimmte Wert für Cascarosid A war $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ und für Cascarosid B $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$. Die Bestimmung des Drehwinkels unserer isolierten Cascaroside in Methanol ergab für Cascarosid A $[\alpha]_D^{30} = -36.8^\circ$ und für Cascarosid B

$[\alpha]_D^{30} = -104.4^\circ$. Dieses Ergebnis stimmt unter Berücksichtigung des verwendeten anderen Lösungsmittels und der höheren Meßtemperatur in etwa mit den angegebenen Werten überein. Auffallend war allerdings, daß Cascarosid A bei 578 nm -35.3° , bei 546 nm dagegen nur -31.9° drehte. In der Regel steigen die Drehwerte, absolut betrachtet, zur kürzeren Wellenlänge hin an. Diese Erscheinung zeigte sich auch bei dem aus Curaçao-Aloe isolierten Aloin.

Die von uns nach 3stündiger Hydrolyse mit 0.1N Schwefelsäure bei 70°C unter Stickstoffatmosphäre aus den Cascarosiden erhaltenen Aloine zeigten beide eine unterschiedliche negative Drehung ($[\alpha]_D^{25} = -16.3^\circ$ aus Cascarosid A und $[\alpha]_D^{23} = -42^\circ$ aus Cascarosid B), während FAIRBAIRN aus Cascarosid A ein (+)-Algin ($[\alpha]_D^{20} = 7.6^\circ$) und aus Cascarosid B ein (-)-Aloin ($[\alpha]_D^{20} = -47.8^\circ$) erhalten hatte. Möglicherweise beeinflußt die Hydrolysedauer den teilweisen Übergang von dem anfangs vorliegenden Aloin in die andere diastereomere Form und bedingt dadurch abweichende Drehwerte.

Weitere Hinweise auf die strukturellen Unterschiede von Cascarosid A und B sollte die Messung des CD (Circular-Dichroismus) 86) 87) 88) bringen.

Die von Cascarosid A und B in Trifluoräthanol (siehe Abb. 22) und von Aloin (isoliert aus Curaçao-Aloe, $[\alpha]_D^{23} = +5.1^\circ$) in Acetonitril aufgenommenen Dichrogramme ergaben folgende Mittelwerte:

Cascarosid A: 348(+4.57), 313(-7.29), 285i(-2.45), 259
(+1.92), 241(+3.47), 231(+3.80), 209(-12.9).

Cascarosid B: 366(-2.88), 334(+0.85), 294(-1.15), 264
(-0.55), 252(+1.32), 230(-8.38), etwa 208
(+17).

Aloin: 321(-1.03), 267(-0.65), 247(+1.57), 227(-3.4).

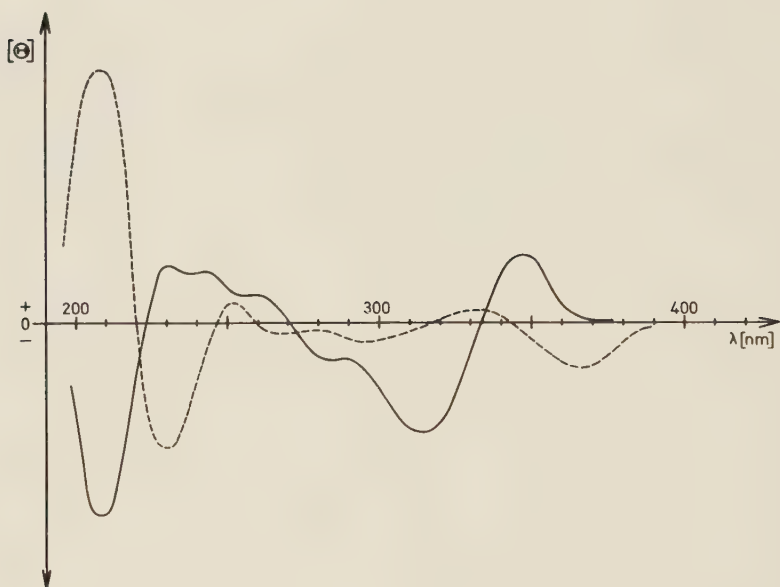


Abb. 22

Circular-Dichrogramme der Cascaroside A (—) und B (---).

Der Rotationsunterschied der beiden Cascaroside bei der NaD-Linie wird auch im CD erkennbar: Für die negative Drehung ist vermutlich die starke kurzwellige Bande bei 209 nm bzw. bei etwa 208 nm verantwortlich. Während die negative Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_L - \epsilon_R$) bei 366 nm die Rotation für Cascarosid B noch verstärkt, wird durch die längstwellige, positive CD-Bande bei Cascarosid A ein Teil der negativen Drehung wegkompensiert.

Da sich die CD-Spektren der beiden Cascaroside nicht nur in den Vorzeichen, sondern auch in der Lage vieler Banden unterscheiden, müßte in beiden Cascarosiden nicht immer der gleiche Chromophor vorliegen.

Das Auftreten der längstwelligsten Bande im CD des Aloins bei nur 321 nm im Gegensatz zu den Cascarosiden könnte folgenden Grund haben: Beim Aloin kann die Carbonylgruppe mit beiden OH-Gruppen eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Durch die über die Gesamtheit aller Moleküle vorliegende Symmetrie wird der CD so klein, daß er nicht mehr in Erscheinung tritt. Bei den Cascarosiden kann dagegen die H-Brückenbildung wegen der glucosidierten C-8-OH nur von einer Seite her erfolgen. Der Ketochromophor wird dadurch stark unsymmetrisch und ergibt starke CD-Banden (z.B. für die R-Bande).

Der strukturelle Unterschied zwischen Cascarosid A und B dürfte nach den bisherigen Ergebnissen nur in der räumlichen Anordnung der Glucose am C-10 liegen. Die CD-Werte widersprechen nicht der Annahme, daß die C-10-Glucose bei den Cascarosiden einmal nach vorne, im anderen Fall nach hinten gerichtet ist.

Auf Grund der Anthronstruktur ist die Möglichkeit zu einer Isomerisierung gegeben, wie es nachfolgend formuliert wird:

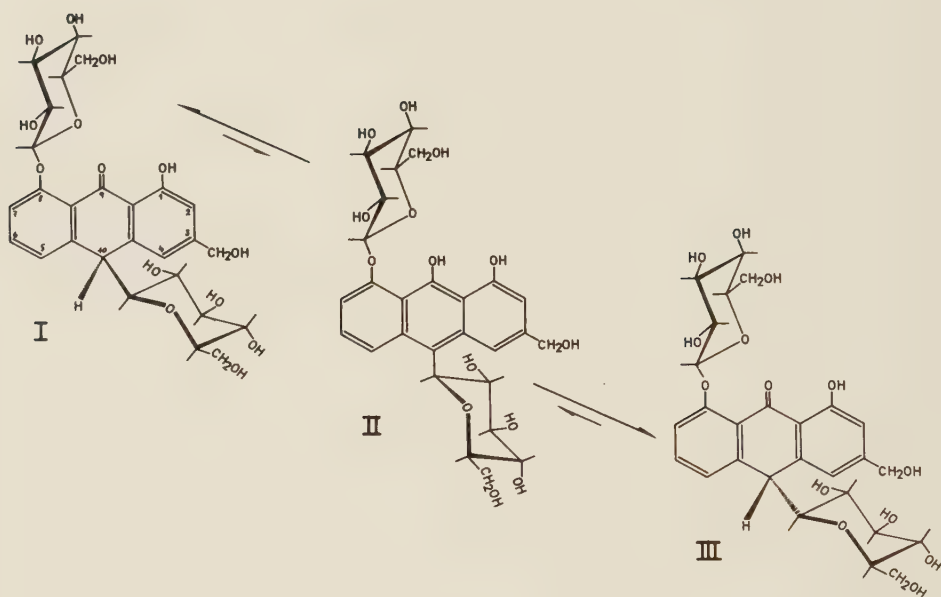


Abb. 23

Die beobachtete Umwandlung eines Cascarosids in das andere bis zu einem Gleichgewicht ist durch den Übergang in die Anthranolform (II) erklärbar; dabei ist das Gleichgewicht stark auf die Seite der Anthronglucoside verschoben.

Für Cascarosid A und B kommen die beiden diastereomeren Formen I und III in Frage (siehe Abb. 23), wobei eine genaue Zuordnung durch den CD allein nicht möglich ist. Das Dreiding-Modell zeigt außerdem, daß I und III jeweils noch in zwei Konformationen auftreten können. Energetisch begünstigt dürfte die Konformation sein, bei der der Sauerstoff der Carbonylgruppe und das C-10-Proton bezogen auf die C-9/C-10-Achse trans-Konfiguration besitzen und die Glucose am C-10 angenähert eine axiale Stellung einnimmt.

Aus den vorliegenden Ergebnissen könnte man schließen, daß auch Aloin in zwei derartigen Diastereomeren vorkommt. Es finden sich zwar in der Literatur Hinweise, daß im Isobarb-aloin ⁸⁹⁾ aus der Westindischen Aloe ein Stereoisomeres des Aloins vorliegen könnte ^{85) 90)}. Die Untersuchungen von DURAND u. PARIS ⁹¹⁾ haben aber ergeben, daß es sich hierbei um keine reine Substanz gehandelt hatte. Auch das von LÉGER ⁹²⁾ beschriebene β -Barbaloin soll keine einheitliche Verbindung gewesen sein ⁹³⁾. Dagegen konnte ZINN ⁹⁴⁾ aus Aloinacetat, das durch Acetylierung von Kap-Aloin hergestellt worden war, durch Verseifung ein Aloin zurückgewinnen, das wie die aus den Cascarosiden erhaltenen Aloine eine negative Drehung aufwies, während das aus Kap-Aloe oder auch das von uns aus Curaçao-Aloe isolierte Aloin einen positiven Drehwert besaß.

Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, verschiedene Formen des Aloins aus der Droge zu isolieren. Offenbar kommt es schon in der Pflanze oder während der Isolierung zur Bildung der anderen diastereomeren Form und damit zur Einstellung eines Mittelwertes bei der Drehung. Erwähnenswert ist allerdings noch, daß die aus den beiden Cascarosiden erhaltenen Aloine mit unterschiedlichem Drehwert gleichen R_F -Wert besitzen.

Bezüglich der Cascaroside muß man daher annehmen, daß die zusätzliche Glucosidierung des Aloinmoleküls die Stabilisierung zweier Stereoisomere begünstigt.

8. Strukturbeitrag für die Cascaroside C und D

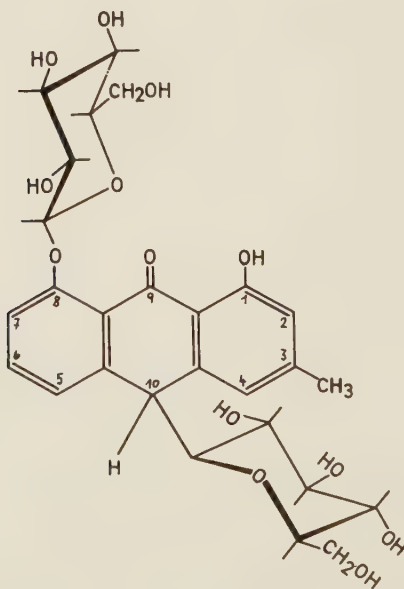
Durch präparative Papierchromatographie einer angereicherten Fraktion der Polyamid-Säulentrennung gelang es auch, kleine Mengen der chromatographisch nachgewiesenen Cascaroside C und D zu isolieren (siehe Abb. 13).

Der bei der Emulsin-Hydrolyse dieser beiden Cascaroside entstandene Niederschlag konnte chromatographisch eindeutig als Chrysophanol identifiziert werden. Die Äthylacetatausschüttelung zeigte am Chromatogramm außerdem einen schwach gelben

Fleck mit dem R_F -Wert 0.65. Dieser lag auf gleicher Höhe wie das Desoxyaloin des Cascara-Extraktes.

Wie bei der Hydrolyse von Cascarosid A und B trat in den Hydrolyselösungen von Cascarosid C und D noch eine Substanz mit höherem R_F -Wert auf. Der chromatographische Vergleich dieser Substanz durch Papier-, Kieselgel-, Polyamid- sowie 2-dimensionale Chromatographie zeigte vollkommene Übereinstimmung mit einer authentischen Probe von synthetisiertem Chrysophanol-8-O- β -D-monoglucosid.

Es ist somit wahrscheinlich, daß es sich bei den Cascarosiden C und D um zwei Stereoisomere des 8-O-(β -D-Glucopyranosyl)-,10-C-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-methyl-9-anthrone oder des 8-O- β -D-Glucopyranosyl-desoxyaloin handelt:



Auch FAIRBAIRN ⁷⁸⁾ hatte die Cascaroside C und D als Derivate des Desoxyaloins beschrieben. Allerdings vermutete er ähnliche Zuckerkomponenten wie bei Cascarosid A und B, d.h. neben einer O-gebundenen Glucose einen zusätzlichen unbekannten Zucker. Außerdem gab er keine Verknüpfungsstelle für die Glucose an.

In den Fraktionen der Polyamid-Säulentrennung mit überwiegendem Gehalt an Cascarosid C, D und Aloin waren zwischen Cascarosid C und Aloin noch 5 - 6 schmale Zonen chromatographisch nachweisbar, bei denen es sich entsprechend ihrer Anfärbbarkeit mit p-Nitroso-N,N-dimethyl-anilin ebenfalls um reduzierte Anthraverbindungen handeln mußte.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Dünnschichtchromatographie

1. Sorptions- und Laufmittel

a) Kieselgel

16 g Kieselgel HF₂₅₄ oder Kieselgel HR (reinst) der Fa. Merck wurden mit 50 ml Wasser angerührt und auf 5 Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen. Die Platten wurden 30 Min. bei 120°C aktiviert.

DC-Kieselgelkarten SIF der Fa. Riedel-de Haën, Seelze.

Polygram SIL G/UV₂₅₄ Kieselgelfertigfolie der Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren.

Laufmittel

Anthraglykoside:

Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (4:4:3)

Aglykone, Permethylläther, Methylzucker:

Benzol-Äthanol (8:2)

Anthraglykosid-Acetate:

Benzol-Äthylacetat (7:3); (1:1)

Chloroform-Äther (85:15)

Zuckerosazon:

Benzol-Aceton (45:55)

b) Polyamid

7.2 g MN-Polyamid zur DC der Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren, wurden mit 36 ml Methanol am Magnetrührer fein suspendiert und auf 5 Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen. Die

Platten wurden 5 Min. bei 100°C getrocknet.

Laufmittel

Anthraglykoside:

Methanol

Methanol-Wasser (6:2)

Aglykone:

Methanol-Benzol (8:2)

c) Cellulose

9 g Cellulosepulver MN 300 G zur DC der Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren, wurden mit 55 ml Wasser am Magnetrührer homogenisiert und auf 5 Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen. Die Platten wurden 15 Min. bei 100°C getrocknet.

Laufmittel

Zucker:

Äthylacetat-Pyridin-Wasser (4:2:2 Oberphase)

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

d) Kieselgur

20 g Kieselgur G der Fa. Merck wurden mit 50 ml Wasser angerührt und wie unter I/1a weiterverwendet.

e) Imprägnierte Schichten

Kieselgel wurde mit der entsprechenden Menge 0.1N Borsäure- oder 0.02M Natriumacetatlösung, Kieselgur mit 0.02M Natriumacetatlösung angerührt und wie oben beschrieben weiterverwendet.

Laufmittel

Zucker:

Äthylacetat-Isopropanol 65% (65:35)

Benzol-Eisessig-Methanol (2:2:6 Oberphase)

Methanol-Chloroform-Aceton-Ammoniak 25% (42:16.5:25:16.5)
n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

2. Sprühreagentien

Anthraglykoside, Aglykone:

5%ige methanolische Kalilauge

Anthronglykoside:

a) Frisch bereitete 0.5%ige wäßrige Echtblausalz-B-Lösung,
anschließend mit 0.1N Natronlauge besprühen.

b) 0.1%ige p-Nitroso-N,N-dimethyl-anilin-Lösung in Pyridin

Anthraglykosid-Acetate:

Vanillin-Schwefelsäure ²⁰⁾

Zucker:

Die Herstellung der 4 folgenden Sprühreagentien erfolgt nach
STAHL ²⁰⁾

Anisaldehyd-Schwefelsäure

p-Anisidinphthalat

Naphthoresorcin-Schwefelsäure

Kaliumpermanganat

Anilinphthalat (siehe A/III/2)

Methylzucker:

Anilinphthalat (siehe A/III/2)

II. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die in Chloroform gelöste Substanz wurde strichförmig auf
nach A/I/1a hergestellten Kieselgel-HR-Platten aufgetragen
(4 - 6 mg/Platte), im angegebenen Laufmittelsystem entwickelt
und nach dem Abdunsten des Laufmittels im UV-Licht betrach-
tet. Die Zonen wurden markiert, ausgeschabt und 3 mal 20 Min.
mit Chloroform p.a. durch Rühren am Magnetprüher extrahiert.
Nach dem Filtrieren wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff
abgeblasen.

III. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, durchgeführt.

1. Laufmittel

Anthraglykoside:

Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (4:3:3)

Aglykone:

Petroläther-Toluol-Xylol-Methanol (4:1:1:2)

Zucker, Polyalkohole:

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

Äthylacetat-Pyridin-Wasser (7:2:1)

n-Butanol-Pyridin-Wasser (7:4:3)

n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (7:1:2)

Methylzucker:

n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase)

2. Sprühreagentien

Anthraglykoside, Aglykone:

5%ige methanolische Kalilauge

Anthronglykoside:

Siehe Sprühreagentien A/I/2

Zucker, Methylzucker:

Anilinphthalatlösung (0.93 g Anilin und 1.66 g Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst)

Nachbehandlung: Einige Minuten auf 105°C erhitzen.

Polyalkohole:

Natriummetaperjodat-Benzidin-Reagens (siehe S. 72)

IV. Präparative Papierchromatographie

Pro Bogen (ca. 43 cm breit) wurden 20 mg Substanz, gelöst in 1 ml des angegebenen Lösungsmittels, strichförmig aufgetragen und im angegebenen Laufmittelsystem entwickelt. Die unter UV 360 nm markierten Zonen wurden sofort ausgeschnitten, zerkleinert und mit Methanol p.a. 3 mal 10 Min. durch Rühren am Magnetrührer eluiert. Die Lösungen wurden durch ein hartes Filter filtriert und am Rotationsverdampfer (nicht über 40°C) zur Trockene eingeeengt. Dadurch konnte herausgelöste Cellulose entfernt werden, die beim nachfolgenden Lösen in Methanol an der Glaswandung haften blieb. Die Lösungen wurden nach den jeweils angegebenen Vorschriften weiterbehandelt.

V. Säulenchromatographie

1. Kieselgelsäulen

Verwendet wurde Kieselgel Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min. bei 3 - 6 cm Säulendurchmesser.

2. Polyamidsäulen

Polyamid ¹⁰⁾ wurde durch wiederholtes mehrstündiges Rühren mit Wasser und anschließend mit Methanol von löslichen Bestandteilen befreit. Nach dem Absaugen wurde das Polyamid mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt und solange gewaschen, bis sich die Schicht gleichmäßig abgesetzt hatte. Die Tropfgeschwindigkeit betrug je nach Säulendurchmesser 15 - 30 Tropfen/Min.

VI. Gaschromatographie

Modell Packard vom Typ 7500 mit einem β -Strahlen-Argon-Ionisationsdetektor und Honeywell-Kompensationsschreiber vom Typ Electronic 17.

Säule: spiralig gebogene Glassäule 2 m / 4 mm

Trärgas: Spezial-Argon der Fa. Linde, Reinheit 99,99%

Papiervorschub: 1 inch/5 Min.

Gasdurchfluß: ca. 70 ml/Min.

1. Methylzucker

Trägermaterial: LAC-2R-446 20% (zweidimensionaler Polyester von Pentaerythritol und Polydiäthylenglycol-adipat) auf Chromosorb WS (45 - 60 mesh)

Säulentemperatur: 165 - 170°C isotherm

2. Methylalditolacetat

Trägermaterial: ECNSS - M 3% (Silicon-Cyanoäthyl, Applied Science Laboratories) auf Gaschrom Q (100 - 120 mesh)

Säulentemperatur: 155 - 165°C isotherm

VII. Präparative Gaschromatographie

Mit Hilfe des Extracell-Zusatzes GC-1 (Fa. Beckman - RJJC Ltd., London) wurde unter den gaschromatographischen Bedingungen VI/1 die gewünschte Substanz aus mehreren eingespritzten Proben in einem bei ca. -50°C gekühlten Schmelzpunktsröhrchen, an das beidseitig PVC-Schläuchchen angefügt waren, aufgefangen.

B. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Mikroanalysen

Die Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

Schmelzpunkte

Wir trockneten die Substanzen bei den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen in der Trockenpistole über Diphosphorpentoxid

und bestimmten den Schmelzintervall auf der Koflerheizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte aus einer Pyridinlösung im Dampfdruckosmometer Mechrolab Modell 301A.

Wassergehaltsbestimmung

Die Substanz wurde bei möglichst hoher Temperatur im Hochvakuum getrocknet. Das trotz scharfer Trocknung nicht abgegebene Wasser wurde nach Karl Fischer titrimetrisch bestimmt.

Optische Drehungen

Die Drehungen wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A2) gemessen.

CD-Messungen

Der Circular-Dichroismus wurde mit einem Circular dichrograph am Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn gemessen. Für die Messung wurden die Cascaroside A und B in Trifluoräthanol, Aloin in Acetonitril gelöst.

UV- u. VIS-Messungen

Einzelmessungen wurden mit einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II oder mit einem Eppendorf Photometer in 1 cm Küvetten durchgeführt. Spektren wurden mit einem Beckman DK-2A ratio recording Spektrophotometer aufgenommen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckman-Spektrophotometer IR-8 in KBr aufgenommen.

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem Varian A-60 A

und am Max-Planck-Institut für Biochemie München mit einem Varian HA-100 Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

Massen-Spektren

Die ES-Massenspektren wurden mit einem Varian MAT SM 1-A bei 70 eV und 300 μ A, die FI- bzw. FD-Spektren mit einem Massenspektrometer CEC-21-110B und das Methylalditolacetat mit einem LKB Gaschromatograph-Massenspektrometer aufgenommen.

Für die Ausführung der Mikroanalysen, optischen Drehungen, Molekulargewichts- und Wassergehaltsbestimmungen, IR- und NMR-Spektren sowie für die Unterstützung bei der Interpretation der NMR-Spektren danke ich Herrn O.Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

Herrn Priv.-Doz. Dr.W.Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie München, bin ich für die Aufnahme der ES-Massenspektren und Mithilfe bei der Diskussion zu Dank verpflichtet.

Außerdem gilt mein Dank Frl. Schild, Max-Planck-Institut für Biochemie München, für die Ausführung der hochauflösenden NMR-Spektren, Herrn Prof.H.D.Beckey, Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn, für die Aufnahme des FI- und FD-Massenspektrums und Herrn Prof.B.Lindberg, Institut für Organische Chemie der Universität Stockholm, für die massenspektrometrische Messung und den Vergleich des Methylalditolacetates.

Für die CD-Daten und die wertvollen Hinweise zur Interpretation danke ich Herrn Prof.G.Snatzke, Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn.

C. Strukturaufklärung von Frangulin B

I. Isolierung

500 g grobgepulverte Faulbaumrinde wurden gut mit Wasser durchfeuchtet und zur Anreicherung der Franguline AB durch Autohydrolyse 12 Stdn. stehengelassen. Ein Teil der abgepreßten und getrockneten Droge wurde mit Äthylacetat, der andere Teil mit Äther 3 Tage im Soxhlet extrahiert und die Äthylacetatausschüttelung der Preßflüssigkeit mit dem Äthylacetatextrakt aus der Droge vereinigt. Die am Rotationsverdampfer eingeeengten Auszüge ergaben aus der Äthylacetatextraktion 35 g, aus der Ätherextraktion 12 g orangerot gefärbtes, amorphes Pulver. Letzteres erwies sich chromatographisch reiner.

Verreibungen dieser Extrakte wurden auf eine Polyamidsäule (A/V/2) aufgetragen. Bei der Polyamid-Chromatographie läuft Frangulin A vor Frangulin B.

	1. Trennung	weitere Trennungen
Auftrag. Verreibung:	5 g Extrakt + 10 g Polyamid	150 mg Extr. d. vorhergeh. Trenn. + 1 g Polyamid
Säulenhöhe:	60 cm	40 cm
Säulendurchmesser:	6.5 cm	3 cm
Adsorbens: Polyamid	Korngr. 100- 150 µm	100-150 µm bzw. bis 60 µm
Laufmittel: Methanol		
Tropfgeschwindigkeit:	30 Tropf./Min.	15 Tropf./Min.

Die Fraktionen zu 50 bzw. 20 ml wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und entsprechend vereinigt.

Ausbeute: nach 3. Trennung ca. 20 mg/Säule chromatographisch reines, gelbes Frangulin B

Gleichzeitig konnte Frangulin A isoliert werden.

Frangulin B

Schmp.: 196°C

DC: Polyamid/Methanol $R_f = 0.35$

Kieselgel/Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

$R_f = 0.81$

$C_{20}H_{18}O_9$ (402.35) Ber. C 59.70 H 4.51

Gef. C 59.43 H 4.65

UV (Methanol p.a.): λ_{max} . 224 nm, (246), 262, 282, (301),
431

IR (in KBr): CO (C-10) 1670 cm^{-1} ; CO mit H-Brücken (C-9)
 1625 cm^{-1} ; OH $3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$.

NMR - 60 MHz $[(CD_3)_2SO + CF_3CO_2D, TMS\text{ int.}]$ (siehe Abb. 1,
S. 9):

Aglykon (Emodin): H-4: $\delta = 7.32\text{ ppm}$ (d, $J = 1.5\text{ Hz}$); H-5:
 $\delta = 7.13$ (d, $J = 2.5\text{ Hz}$); H-2: $\delta = 7.01$ (d,
 $J = 1.5\text{ Hz}$); H-7: $\delta = 6.75$ (d, $J = 2.5\text{ Hz}$);
 $CH_3\text{-Ar}$: $\delta = 2.35$ (s, br) 3H.

Zucker: CH-1': $\delta = 5.69\text{ ppm}$ (d, $J = 3\text{ Hz}$); CH-2': $\delta = 4.27$
(d, $J = 3\text{ Hz}$); CH₂-4': $\delta = 4.16$ (d, $J = 9.5\text{ Hz}$),
 $\delta = 3.85$ (d, $J = 9.5\text{ Hz}$) 2H; CH₂-3": $\delta = 3.49$ (tr,
 $J = 16.5\text{ Hz}$) 2H.

Frangulin A

Schmp.: 228°C

DC: Polyamid/Methanol $R_f = 0.44$

Kieselgel/Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

$R_f = 0.78$

$C_{21}H_{20}O_9$ (416.38) Ber. C 60.57 H 4.84

Gef. C 60.50 H 5.02

II. Charakterisierung des Zuckeranteils

1. Hydrolysen von Frangulin B

a) saure Hydrolyse

4 - 10 mg Substanz wurden mit 5 ml 2.5%iger methanolisch-wäßriger H_2SO_4 30 Min. unter Rückfluß hydrolysiert.

Nach dem Abdampfen des Methanols wurde mit 3 mal 10 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde säurefrei gewaschen, eingengt und chromatographisch nach A/I und A/III untersucht.

Die vom Aglykon befreite wäßrige Zuckerlösung neutralisierten wir mit feingepulvertem Bariumhydroxid und untersuchten sie nach dem Einengen auf 1 ml dünnenschicht- und papierchromatographisch nach A/I/1c,d,e bzw. A/III:

z.B.: Kieselgel Na-Ac. gepuff./Äthylacetat-Isopropanol 65% (65:35) $R_f = 0.45$ (0.84; 0.90); Rhamnose $R_f = 0.49$.

Papier 2043 b / n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

$R_f = 0.48$; Rhamnose $R_f = 0.45$.

b) enzymatische Hydrolyse

Siehe S. 85

2. Perjodsäureoxidation

20 - 30 mg Substanz werden genau gewogen und in 10 ml Methanol p.a. gelöst. Nach dem Ansäuern mit 10 ml 2N H_2SO_4 fügt man 300 - 500 mg Natriummetaperjodat (genau gewogen) hinzu und erhitzt 2 Stdn. unter Rückfluß auf dem Dampfbad. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in einem Meßkölbchen auf 100.0 ml verdünnt. 10.0 ml davon werden in einem Jodzählkolben mit 10 ml 2N H_2SO_4 versetzt und nach Zugabe einiger Körnchen Kaliumjodid 20 Min. im Dunkeln stehengelassen. Anschließend wird mit 1/10 N Natriumthiosulfatlösung unter Zusatz von

Stärkelösung bis zur Farblosigkeit titriert.

Der Titrationswert eines Blindversuchs mit einer reinen Natriummetaperjodatlösung (ca. 180 mg NaJO_4 in 100.0 ml) wird auf die Einwaage des Hauptversuchs umgerechnet.

Die Anzahl n der verbrauchten Mol Perjodat pro Mol Polyalkohol ergibt sich zu:

$$n = \frac{(a - b) \cdot \text{MG}}{20 \cdot E}$$

a = ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ des Blindversuchs (auf Einwaage des Hauptversuchs umgerechnet)

b = ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ des Hauptversuchs

MG = annäherndes Molekulargewicht des Polyalkohols

E = Einwaage Polyalkohol in mg/10.0 ml

Zucker	Durchschnittl. Mol Perjodat pro Mol Zucker
Rhamnose (Quercitrin)	3.6
Rhamnose (Frangulin A)	3.4
Zucker X (Frangulin B)	2.8

3. Perjodatabbau

Etwa 5 μMol der zu untersuchenden Substanz werden mit 10 μMol Natriummetaperjodat in 0.1 ml Methanol-Wasser-Mischung gelöst. Nach etwa 4 Stdn. wird eine Lösung von 2 mg Natriumborhydrid in 0.1 ml Wasser hinzugefügt. Nach 12stündigem Stehen im Dunkeln versetzt man das Reaktionsgemisch mit 0.2 ml N HCl und erhitzt 15 Min. im siedenden Wasserbad. Um vergleichbare Resultate zu erzielen, wird die Lösung auf 0.5 ml aufgefüllt und chromatographisch auf Celluloseplatten (A/I/1c) oder Papier (A/III) in n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) und Äthyl-

acetat-Pyridin-Wasser (7:2:1) untersucht. Als Vergleichssubstanzen läßt man Glycerin, Äthylenglycol und Propylenglycol mitlaufen.

Zur besseren Chromatographie empfiehlt es sich, Emodin mit Äther auszuschütteln, abzuhebern und anschließend das Hydrolysat mit Dowex 2 (HCO_3^- -Form) oder mit Di-n-octylamin zu neutralisieren.

Das luftgetrocknete Chromatogramm wird zunächst mit einer 0.5%igen Natriummetaperjodatlösung besprüht (zuviel Perjodat ist zu vermeiden, da sonst die Flecken leicht überdeckt werden). Nach 5 Min. sprüht man eine Benzidinlösung (0.5 g Benzidin, 20 ml Eisessig, 80 ml absoluter Alkohol) auf. Das Papier färbt sich dabei tiefblau an. An den Stellen jedoch, an denen das Perjodat durch Glycerin, Äthylenglycol oder Propylenglycol verbraucht wird, entstehen helle Flecken.

II. Derivate von Frangulin B

1. Frangulin-B-Pentaacetat

200 mg Frangulin-AB-Gemisch mit überwiegendem Frangulin-B-Anteil wurden in 3 ml Pyridin gelöst, 5 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt, über Nacht bei Raumtemperatur am Magnetrührer gerührt und anschließend 1/2 Std. auf 80°C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch unter kräftigem Umrühren in 100 ml Eiswasser gegossen, 1 Std. gerührt und dann abgenutscht.

Das aus 3 Substanzen bestehende Acetylierungsgemisch trennten wir über eine Kieselgelsäule (A/V/1) mit Benzol-Äthylacetat (7:3) und kristallisierten in Methanol um.

Geringe Mengen für die Massenspektrometrie isolierten wir durch präparative Dünnschichtchromatographie (A/II) auf Kieselgel-HR-Platten im gleichen Laufmittelsystem.

Schmp.: 167 - 169°C; $[\alpha]_D^{20} = -88.6^\circ$ (c = 1.14 in Methanol)

DC: Kieselgel / Benzol-Äthylacetat (7:3) $R_f = 0.45$

(Frangulin-A-Pentaacetat $R_f = 0.52$)

$C_{30}H_{28}O_{14}$ (612.54) Ber. C 58.83 H 4.61

Gef. C 59.05 H 4.50

5 CH_3CO (1t. NMR)

FD-MS: $M^{+} = 612$ (siehe Abb. 5, S. 19)

IR (in KBr): Ester-CO 1745 cm^{-1} ; Keto-CO 1670 cm^{-1}

NMR - 100 MHz ($CDCl_3$, TMS int.) (siehe Abb. 2, S. 11):

Aglykon (Emodin): H-4: $\delta = 7.99\text{ ppm}$ (s); H-5: $\delta = 7.79$

(d, J = 2.5 Hz); H-2: $\delta = 7.20$ (s); H-7:

$\delta = 7.01$ (d, J = 2.5 Hz); CH_3 -Ar: $\delta = 2.48$

(s) 3H; AcO-Ar: $\delta = 2.41$ (s) 6H.

Zucker: CH-1': $\delta = 5.79\text{ ppm}$ (s); CH-2': $\delta = 5.67$ (s); CH-3",

CH_2 -4': $\delta = 4.83$ (d, J = 13 Hz); $\delta = 4.60$

(d, J = 13 Hz); $\delta = 4.42$ (d, J = 11 Hz); $\delta = 4.28$

(d, J = 11 Hz) 4H; AcO-Zuck.: $\delta = 2.13, 2.11, 2.06$

(s) 9H.

2. Frangulin-B-Permethylläther

50 mg Frangulin B bzw. 100 mg Frangulin-AB-Gemisch mit überwiegendem Frangulin-B-Anteil wurden nach 12stündigem Trocknen über Diphosphorpentoxid bei $100^\circ\text{C}/12\text{ Torr}$ in 3 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) "für Spektroskopie" der Fa. Fluka oder frisch destilliertem DMF gelöst. Unter ständigem Rühren im Eisbad gaben wir 0.5 g Bariumhydroxid $\cdot 8\text{ H}_2\text{O}$, 1.0 g peroxidfreies Bariumoxid der Fa. Degussa und 1.2 ml frisch destilliertes Dimethylsulfat (DMS) hinzu. Nach Zusatz von Sikkon Fluka methylierten wir 3 Tage unter Stickstoffatmosphäre unter kräftigem Rühren am Magnetührer.

In weiteren Versuchen fügten wir statt DMS tropfenweise 3 ml Methyljodid als Agens hinzu und methylierten unter Lichtab-

schluß und kräftigem Schütteln 1 Tag. Vorteilhaft erwies sich bei dieser Methylierung Silberoxid (3 g) als säurebindendes Mittel.

Die anfangs tiefrote Mischung wurde allmählich orangerot. Nach erneuter Zugabe von 1 g Bariumoxid und 1 ml DMS bzw. 0.5 g Bariumoxid oder Silberoxid und 1.5 ml Methyljodid methylierten wir weitere 2 Tage bzw. 1 Tag.

Die nun gelbe Suspension wurde mit 50 ml Chloroform verdünnt, dann mit 5 ml Wasser, 5 ml 15%iger Natriumthiosulfatlösung (bei der CH_3J -Methylierung), 5 ml 5%iger Kalilauge und schließlich mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach Abdestillieren des Chloroforms und Entfernen der höhersiedenden Lösungsmittel durch azeotrope Destillation mit Toluol im Vakuum erhielten wir ein Methylierungsprodukt, das chromatographisch aus mehreren Flecken bestand.

Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel HF / Benzol-Äthanol (8:2)

Frangulin-B-Methyläther (Hauptfleck): $R_f = 0.69$ dunkelgrün bei UV 360 nm

IV. Derivate des Frangulin-B-Zuckers

1. Darstellung des Phenyllosazons

Die nach der Hydrolyse (C/II/1a) von 15 mg Frangulin B vom Aglykon befreite und neutralisierte wäßrige Phase wurde durch azeotrope Destillation zur Trockene eingeeengt. Der so gewonnene Zucker wurde mit 8 mg frisch umkristallisiertem Phenylhydrazin und 12 mg Natriumacetat in 0.2 ml Wasser versetzt. In einem Mikroeagezglas, das durch einen PVC-Schlauch mit einem Steigrohr verbunden war, wurde die Lösung 1 Std. durch Eintauchen in kochendes Wasser erhitzt. Das nach dem Erkalten ausgefallene Osazon wurde zentrifugiert, von der überstehen-

den Lösung dekantiert und aus 30%igem Äthanol umkristallisiert.

Schmp.: 153 - 155°C (Lit.: Phenylsazon der Apiose Werte von 148 - 157°C)

ES-MS: $M^{+} = 328$

Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel HF / Benzol-Aceton (45:55) $R_f = 0.53$

Zur Intensivierung der gelben Farbe können Osazone mit methanolischer Kalilauge besprüht werden.

2. Darstellung des Methylzuckers

a) Hydrolyse des Frangulin-B-Permethyläthers

Das nach C/III/2 erhaltene Methylierungsgemisch wurde in 5 ml 5%iger methanolischer Salzsäure 5 Std. am Rückflußkühler hydrolysiert. Es wurde mit 2 ml Wasser verdünnt, das Methanol entfernt und nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Aglykons erneut 1 Std. unter Rückfluß hydrolysiert.

Nach dem Ausschütteln des in Chloroform gelösten Aglykons mit 5%iger Sodalösung konnte in der Chloroformphase, vorwiegend bei der DMS-Methylierung, auch C-6 methyliertes Emodin nachgewiesen werden, d.h. daß während der Methylierung eine teilweise Spaltung des Frangulins eingetreten war.

Die vom Aglykon befreite wäßrige Zuckerlösung wurde durch Silberoxid oder Dowex 2 (HCO_3^- -Form) neutralisiert, filtriert und bei 40°C durch azeotrope Destillation mit Benzol und Äthanol vom Wasser befreit.

b) Reinigung und chromatographischer Nachweis des Methylzuckers

Der Frangulin-B-Methylzucker wurde präparativ (A/II) auf selbstgestrichenen Kieselgel-HR-Platten von geringen Resten partiell methylierten Emodins und von 2,3,4-Trimethylrhamnose

des Frangulin A gereinigt. Die Zone des Frangulin-B-Methylzuckers wurde unter UV 360 nm auf Grund einer angrenzenden fluoreszierenden Verunreinigung markiert, ausgekratzt und mehrmals mit Chloroform p.a. am Whirlimix eluiert.

Der Methylzucker wurde dünnschicht-, papier- und gaschromatographisch untersucht:

Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel HF / Benzol-Äthanol (8:2), Anilinphthalat
Methylzucker von Frangulin B $R_f = 0.54$ (ockerbraun)
2,3,4-Tri-O-methylrhamnose $R_f = 0.60$ (dunkelbraun)

Papierchromatographie:

(siehe Tab. 1, S. 15)

Schleicher u. Schüll 2043 b

n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase) / Anilinphthalat
Methylzucker von Frangulin B $R_{TG} = 0.94$ (ockerbraun)
2,3,4-Tri-O-methylrhamnose $R_{TG} = 1.02$ (graubraun)

Gaschromatographie nach A/VI/1:

(siehe Abb. 4, S. 16)

20% LAC-2R-446 auf Chromosorb WS, Säulentemp. 168°C

	Retentionszeit
Methylzucker von Frangulin B	20.4 Min.
2,3,4-Tri-O-methylrhamnose	18.2 Min.

c) Präparative Gaschromatographie

Der Methylzucker konnte als schwach gelblich gefärbte Tröpfchen aufgefangen werden (GC-Bedingungen siehe A/VII und A/VI/1).

Die nochmalige GC und DC des so gewonnenen Methylzuckers zeigte, daß die Substanz bei 220°C Detektortemperatur unverändert geblieben war.

Dieser gc gereinigte Methylzucker wurde für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet.

FI-MS: $M^{+} = 192$

3. Darstellung des Methylzuckeralditolacetates

a) Reduktion mit Natriumborhydrid

Etwa 1 mg partiell methylierter Zucker (C/IV/2b) wurde in 5 ml Wasser mit 10 mg Natriumborhydrid im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stdn. stengelassen. Dann wurden durch spatelweise Zugabe von frisch regeneriertem Dowex 50 (H^{+} -Form) und kräftigem Mischen am Whirlimix die Na^{+} -Ionen entfernt. Anschließend filtrierte man in ein Schliffkölbchen, wusch 2 mal mit 2 ml Wasser nach und engte am Rotationsverdampfer bei $40^{\circ}C$ zur Trockene ein.

b) Entfernen der Borsäure

Die Probe wurde mit je 3 ml Methanol versetzt und der gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei $40^{\circ}C$ entfernt. Diesen Vorgang wiederholte man 4 mal, um die Borsäure quantitativ zu entfernen, da Reste von Borsäure die nachfolgende Acetylierung stören würden.

c) Acetylierung

In die Schliffkölbchen pipettierte man 2 ml einer Mischung von Pyridin p.a. und Essigsäureanhydrid p.a.. Der Schliffstopfen wurde mit einer PVC-Folie fixiert und das Kölbchen 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 5 ml Wasser verdünnt und im Vakuum zur Trockene eingengt, bis der Rückstand nicht mehr nach Pyridin oder Essigsäure roch.

Der am Schliffkolben als harziger Belag sichtbare Rückstand wurde in 0.2 ml Chloroform p.a. aufgenommen und nach A/VI/2 gaschromatographisch untersucht.

Einspritzmenge: 6 μ l

Wir fanden für das Methylallditolacetat des Frangulin-B-Zuckers einen $R_{TGlucit.}$ von 0.52 (siehe Abb. 8, S. 26).

Das Massenspektrum wurde nach gaschromatographischer Reinigung über eine Polyphenyläther OS 138 SCOT-Säule in einem LKB-Gaschromatograph-Massenspektrometer aufgenommen.

Registriert m/e 233 = $(M-45)^+$.

(siehe Fragmentierungsschema S. 28).

V. Spektralphotometrische Bestimmung der D-Apiose

1. Herstellung der verwendeten Zuckerlösung

5 mg Frangulin B, genau gewogen, wurden mit 2 ml 0.5N H_2SO_4 1 Std. bei $100^\circ C$ hydrolysiert. Die mit Chloroform vom Aglykon befreite Zuckerlösung wurde im Meßkölbchen auf 5.0 ml aufgefüllt. 1.0 ml dieser Lösung wurde nochmals auf 5.0 ml verdünnt ($\approx 4.97 \cdot 10^{-4}$ molar) und für die folgenden Bestimmungen verwendet.

Zur Durchführung wurden einheitliche Reagenzgläser mit Schliffstopfen benützt.

2. Bestimmung A

2.25 ml einer konz. H_2SO_4 -Wasser-Mischung (6:1 V/V) werden unter Eiskühlung zu 0.25 ml Zuckerlösung vorsichtig hinzugefügt, so daß sich zwei Phasen bilden. Durch kräftiges Schütteln in Eiswasser werden die beiden Schichten sorgfältig gemischt, dann 2 Min. lang in Leitungswasser gehalten und anschließend genau 3 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen der Probe in Leitungswasser auf Zimmertemperatur wird die Extinktion bei 276.5 nm im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II gegen eine Blindlösung gemessen und daraus der molare Extinktionskoeffizient errechnet.

Die Bestimmungen B und C müssen, wenn nichts anderes vermerkt, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

Maximale Ausbeute der UV-absorbierenden Stoffe wird nicht erreicht.

Das Endvolumen der Probe wurde mit 2.5 ml angenommen. In unserer Bestimmung ergab sich $\epsilon_{\text{mol}/276.5} = \frac{E}{c \cdot d} = 2.01 \cdot 10^4 [\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2]$.

3. Bestimmung B

0.25 ml Zuckerlösung werden mit 0.25 ml einer wäßrigen Fructoselösung (0.1% G/V) und vorsichtig mit 2.25 ml einer konz. H_2SO_4 -Wasser-Mischung (6:1 V/V), wie bei Bestimmung A beschrieben, versetzt. Nach dem 3min. Erhitzen im siedenden Wasserbad und Abkühlen mit Leitungswasser werden die Proben 10 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen, bevor die Extinktion bei 449 und 500 nm bestimmt wird. Berechnet wird die Differenz ($\epsilon_{449} - \epsilon_{500}$).

Das Endvolumen wurde mit 2.75 ml angesetzt. $\epsilon_{\text{mol}/449,500}$ ergab sich in unserem Versuch zu $2.21 \cdot 10^4 [\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2]$.

4. Bestimmung C

0.25 ml Zuckerlösung werden, wie bei Bestimmung B beschrieben, behandelt. Nach dem 3min. Erhitzen und Abkühlen mit Leitungswasser werden unter Schütteln 50 μl einer wäßrigen Cystein-HCl-Lösung hinzugefügt. Die Mischung bleibt dann 7 - 30 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, bevor die Extinktion bei 463 und 500 nm gemessen wird. Berechnet wird die Differenz ($\epsilon_{463} - \epsilon_{500}$).

Das Endvolumen wurde mit 2.8 ml angenommen. Bei unserer Bestimmung betrug $\epsilon_{\text{mol}/463,500} = 2.25 \cdot 10^4 [\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2]$ (Siehe Tab. 3, S. 30).

D. Versuche zur Struktur von Emodin-8-O-glucosid und Emodin-1-O-oder -8-O-diglucosid

I. Isolierung

0.8 g Frangula-Trockenextrakt (Frangoselect der Fa. Inverni u. della Beffa, Mailand) wurden mit 3 g Kieselgel sorgfältig verrieben und vorsichtig auf eine Kieselgelsäule aufgetragen.
Adsorbens: Kieselgel 0.05 - 0.2 mm

Säulenhöhe: 40 cm

Säulendurchmesser: 4.5 cm

Laufmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Es wurden Fraktionen zu 20 ml aufgefangen und nach dünn-schichtchromatographischer Überprüfung entsprechend vereinigt. Wichtig für die Isolierung waren die orangerot gefärbte Zone (Emodinmonoglucosid) nach den gelb erscheinenden Aglykonen und Frangulinen und die ebenfalls orangerot gefärbte Zone (Emodindiglucosid) nach den dunkelgelb erscheinenden Glucofrangulinen.

Emodin-8-O-glucosid

Schmp.: 202 - 203°C

DC (Abb. 10, S. 33):

Kieselgelkarten SIF (A/I/1a) / Äac-MeOH-Wa (100:17:13)

$$R_f = 0.61$$

Polyamid / Methanol / 360 nm $R_f = 0.27$ (rot)

UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$ 269 nm, 281, (300), 414

(Methanol/NaOH): 414 $\longrightarrow$ 487 nm (siehe Abb. 11, S. 35)

Emodin-1-O- oder -8-O-diglucosid

Schmelzbereich: 170 - 176°C

DC: Kieselgelkarten SIF / Äac-MeOH-Wa (100:17:13) $R_f = 0.29$

Polyamid / Methanol / 360 nm $R_f = 0.41$ (rot)

UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$ 263, 282, (301), 411
(Methanol/NaOH): 411 $\longrightarrow$ 487 nm (siehe Abb. 12,
S. 37)

II. Hydrolyse

Etwa 5 mg der nach D/I isolierten Glykoside wurden mit 5 ml 0.1N methanolisch-wäßriger H_2SO_4 30 Min. unter Rückfluß hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde, wie unter C/II/1a beschrieben, weiterbehandelt.

Das Aglykon von beiden Glykosiden stimmte chromatographisch nach A/I/1a,b und A/III mit der Testsubstanz Emodin überein. Schmp.: 254 - 256°C (Lit. 255 - 256°C)

Die Zuckerlösung wurde papierchromatographisch nach A/III jeweils in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen überprüft und ergab für beide Glykoside Glucose als Zuckeranteil.

E. Strukturaufklärung der Cascaroside

I. Isolierung der Cascaroside A und B

7.5 g Cascara-Extrakt der Milanfarma, Mailand, ein z.T. von Gerb- und Begleitstoffen befreiter, schwach angereicherter Extrakt, wurde mit 15 g Polyamid sorgfältig verrieben und vorsichtig auf eine Polyamidsäule aufgetragen.

Säulenhöhe: 80 cm

Säulendurchmesser: 6 cm

Adsorbens: Polyamid 100 - 150 μ m

Laufmittel: Wasser

Tropfgeschwindigkeit: 25 Tropfen/Min.

Die Elution konnte unter UV 360 nm durch verschieden farbig fluoreszierende Zonen verfolgt werden. Auf zwei sehr schmale

gelbe Zonen folgten zwei fast ineinander übergehende dunkelrote Zonen, die vorwiegend den Cascarosiden A und B entsprachen. Daran schlossen sich eine graublaue, gelbbraune, türkisfarbene, gelbbraune, rötlichblaue und noch weitere Zonen an.

Es wurden je nach Zonenbreite Fraktionen von 100 bis 250 ml aufgefangen und gefriergetrocknet. Die erhaltenen, hellgelb gefärbten Substanzen enthielten Cascaroside, Aloin und Desoxyaloin in unterschiedlicher Konzentration.

Aus den mit den Cascarosiden A und B angereicherten Fraktionen wurden durch präparative, absteigende Papierchromatographie (A/IV) diese beiden Cascaroside isoliert.

Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b Mgl

Laufmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

Laufzeit: mindestens 15 Stdn.

Die Substanz wurde in Methanol gelöst und strichförmig aufgetragen.

Nach dem Entwickeln und Trocknen der Chromatogramme erschienen die Cascaroside A und B unter UV 360 nm in einer Höhe von 5 - 12 cm über der Startlinie als dunkelrot fluoreszierende Zonen. Die eluierten und zur Trockene eingeeengten Cascaroside (aus 6 - 8 Chromatogrammen) wurden in 1 - 2 ml Methanol p.a. wieder gelöst, in ein Becherglas übergeführt und mit Chloroform p.a. im Überschuß versetzt, wobei das Cascarosid ausflockte. Nach dem Absetzen oder Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert; den Rest der Lösungsmittel ließen wir abdunsten oder er wurde mit Stickstoff abgeblasen. Wir erhielten hellgelbe, amorphe, chromatographisch reine Substanzen. Die Wassergehaltsbestimmung von Cascarosid A und B ergab 5.62% bzw. 5.87% Wasser, entsprechend 2 Mol H_2O , das auch bei scharfem Trocknen über Diphosphorpentoxid nicht entfernt werden konnte.

Cascarosid A

Schmelzbereich: 184 - 187°C (unter Braunfärbung)

$[\alpha]_D^{30} = -36.8^\circ$ ($c = 0.8786$ in Methanol)

$(\alpha_{578} = -35.3^\circ; \alpha_{546} = -31.9^\circ !)$

DC: Kieselgelkarten SIF (A/I/1a) / Äac-MeOH-Wa (100:17:13) /
meth. KOH - 360 nm $R_f = 0.14$

PC: Papier (A/III) / Äac-MeOH-Wa (100:17:13) / meth. KOH -
360 nm $R_f = 0.11$

$C_{27}H_{32}O_{14} (580.54) \cdot 2 H_2O$

UV (Methanol p.a.): λ_{max} (259), 267, 296, 322, (354) nm

UV-VIS (Methanol/NaOH): λ_{max} 221, 269, 351, 371, 391, (428),
(454) nm

CD (Trifluoräthanol): Konz. 0.86/3.3158

348(+4.57), 313(-7.29), 285i(-2.45),
259(+1.92), 241(+3.47), 231(+3.80),
209(-12.9).

IR (in KBr): CO 1630 cm^{-1} , OH 3200 - 3600 cm^{-1}

NMR - 100 MHz $[(CD_3)_2SO, TMS \text{ int.}]$ (siehe Abb. 18, S. 49):

Aglucon: Ar-OH: $\delta = 11.82$ ppm (s, br) 1H; H-6: $\delta = 7.59$
(tr, $J = 8$ Hz); H-7, H-5: $\delta = 7.27$ (m); H-4: $\delta = 6.98$
(s); H-2: $\delta = 6.83$ (s); Ar-CH₂-O, Ar-CH-Ar:
 $\delta = 4.53$ (s) 3H.

Zucker: CH-1'(-O-Gluc.): $\delta = 4.97$ ppm (s, br); -CH- und HO-
Gluc.: $\delta = 4.0 - 2.6$

NMR - 100 MHz (CD₃OD, TMS int.):

Zucker: CH-1'(-O-Gluc.): $\delta = 4.92$ ppm (d, $J = 8$ Hz): β -Ver-
knüpfung

Cascarosid B

Schmelzbereich: 175 - 178°C (unter Braunfärbung)

$[\alpha]_D^{30} = -104.4^\circ$ ($c = 0.5243$ in Methanol)

DC: Kieselgelkarten SIF (A/I/1a) / Äac-MeOH-Wa (100:17:13) /
meth. KOH - 360 nm $R_f = 0.10$

PC: Papier (A/III) / Äac-MeOH-Wa (100:17:13) / meth. KOH -

360 nm $R_f = 0.08$

$C_{27}H_{32}O_{14}$ (580.54) $\cdot 2 H_2O$

UV (Methanol p.a.): λ_{max} 264, 293, 325, (354) nm

UV-VIS (Methanol/NaOH): λ_{max} 221, 269.5, 350, 370.5, 390.5,
(427), (453) nm

CD (Trifluoräthanol): 366(-2.88), 334(+0.85), 294(-1.15), 264
(-0.55), 252(+1.32), 230(-8.38), etwa
208(+17). Konz.: 0.95/3.1149

IR (in KBr): CO 1630 cm^{-1} , OH $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$

NMR - 100 MHz $[(CD_3)_2SO, TMS\text{ int.}]$ (siehe Abb. 19, S. 49):

Aglucon: Ar-OH: $\delta = 12.05\text{ ppm}$ (s, br) 1H; H-6: $\delta = 7.53$ (tr,
 $J = 8\text{ Hz}$); H-7, H-5: $\delta = 7.22$ (m); H-4: $\delta = 6.91$
(s); H-2: $\delta = 6.76$ (s); Ar-CH₂-O, Ar-CH-Ar: $\delta = 4.52$
(s) 3H.

Zucker: CH-1'(-O-Gluc.): $\delta = 4.93\text{ ppm}$ (d, $J = 7\text{ Hz}$); CH- und
HO-Gluc.: $\delta = 4.0 - 2.6$

NMR - 100 MHz $(CD_3OD, TMS\text{ int.})$:

Zucker: CH-1'(-O-Gluc.): $\delta = 4.94\text{ ppm}$ (d, $J = 8\text{ Hz}$): β -Ver-
knüpfung

II. Hydrolysen

1. Saure Hydrolyse

5 mg Substanz wurden mit 0.1N Schwefelsäure 20 Min. bei 100°C
oder zur schonenderen Spaltung 3 Stdn. bei 70°C unter Stick-
stoffatmosphäre hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Äthyl-
acetat ausgeschüttelt, die Äthylacetatphase säurefrei gewa-
schen und chromatographisch nach A/I/1a und A/III in
Äac-MeOH-Wa (100:17:13) untersucht.

Testsubstanz: Aloin

Sprühreagentien: Methanolische KOH; Echtblausalz-B-Reagens,
p-Nitroso-N,N-dimethylanilin

	Aloin aus Cascarosid A	Aloin aus Cascarosid B
UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$	252, 260, 268.5, 295.5, 358 nm	251, 259, 268.5, 294.5, 360 nm
Optische Drehung	$[\alpha]_D^{25^\circ} = -16.3^\circ$ (c = 0.258 in MeOH)	$[\alpha]_D^{23^\circ} = -42^\circ$ (c = 0.2243 in MeOH)

Aloin-Test aus Curaçao Aloe: $[\alpha]_D^{23^\circ} = +5.12^\circ$ (c = 0.8872 in
MeOH)
 $(\alpha_{578} = +4.5^\circ; \alpha_{546} = +3.4^\circ !)$

Die wäßrige Zuckerlösung der Hydrolyse wurde mit fein verriebem Bariumhydroxid neutralisiert, filtriert und durch azeotrope Destillation auf 0.5 ml eingeeengt.

Die papierchromatographische Überprüfung (A/III) ergab in n-Bu-Ei-Wa (42 - 44 Stdn. Laufzeit) und Äac-Pyr-Wa (26 Stdn. Laufzeit) für Cascarosid A und B nur Glucose.

Die 20min. Hydrolyse mit 5%iger Salzsäure bei 100°C lieferte als Aglykon vorwiegend Aloeemodin.

2. Enzymatische Hydrolyse

10 mg Substanz wurden in 10 ml Soerenssen-Puffer (51.0 g 1/15 M KH_2PO_4 -Lösung + 49.0 g 1/15 M Na_2HPO_4 -Lösung) gelöst, 2 mg Enzym (Emulsin, β -Glucosidase oder Naringinase) hinzugefügt und 5 Tage im Trockenschrank auf genau 35°C gehalten. Stellte das Reaktionsgemisch keine klare Lösung dar, so wurde es am Magnetrührer in Bewegung gehalten. In einem Parallelversuch wurden die Aktivität und in einem Blindversuch mit

inaktiviertem Enzym die Veränderungen durch andere Reaktions-
einflüsse festgestellt.

Der entstandene Niederschlag wurde nach A/I/1 und A/III auf
Aglykon (Aloeemodin), die Äthylacetatausschüttelung und die
wäßrige Phase auf Anthraglykoside chromatographisch unter-
sucht. (siehe Abb. 16, S. 44)

III. Quantitative spektrophotometrische Bestimmungen

1. Aglykonbestimmung

2 - 4 mg Glykosid, genau gewogen, werden in 5 ml 5%iger Salz-
säure unter FeCl_3 -Zugabe (ungefähr 20 mg) bei 100°C hydroly-
siert. Das Hydrolysengemisch wird mit 10 ml Wasser verdünnt
und das Aglykon mit 3 mal 10 ml Äther quantitativ ausgeschüt-
telt. Den Äther wäscht man säurefrei, bringt das Aglykon
durch zweimaliges Ausschütteln mit je 10 ml 5%iger Natronlau-
ge in die alkalische Phase und verdünnt diese in einem Meß-
kolben mit Methanol p.a. auf 100.0 ml. Diese Lösung wird ge-
gen eine Vergleichslösung aus 20 ml 5%iger Natronlauge und 80
ml Methanol p.a. in 1 cm Küvetten im Eppendorf Photometer bei
546 nm (Quecksilberdampfampe) gemessen.

Für die Berechnung des Aloeemodingehaltes der Cascaroside
legten wir die im Parallelversuch mit Aloin erhaltene Extink-
tion als Bezugswert zugrunde und rechneten auf Aloeemodin-
anthron um.

T a b e l l e 4

Mittelwerte der Agluconbestimmung von
Cascarosid A und B

Substanz	Einwaage	Extinktion	Aloeemodin- gehalt	Entsprech. Aloeemodin- anthronge- halt
Aloin (MG 418)	2.5 mg	0.150	1.62 mg	1.53 mg
Cascarosid A (MG 580)	3.1 mg	0.128	1.38 mg	1.31 mg
Cascarosid B (MG 580)	2.9 mg	0.121	1.31 mg	1.24 mg

Für Cascarosid A ergab sich ein Mittelwert von 42.1%, für Cascarosid B einer von 42.9% Aloeemodinanthron.

2. Zuckerbestimmung mit der Anthron-Methode

2 - 6 mg Glykosid werden mit der 100fachen Menge 3N wäßriger Schwefelsäure in einer Glasampulle 3 Stdn. bei 100°C hydrolysiert. Die Hydrolysenlösung wird mit 5 ml Chloroform ausgeschüttelt, filtriert und auf 10.0 ml ergänzt.

2.0 ml des gekühlten Hydrolysates werden mit Natronlauge auf pH 4 - 7 gebracht, tropfenweise mit 6%iger wäßriger Ammonium-reineckatlösung bis zur leichten Rosafärbung der Lösung versetzt und auf 5.0 ml mit Wasser ergänzt.

2.0 ml dieser Lösung werden im Eisbad mit 5.0 ml 0.2%iger Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure versetzt und 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Extinktion bei 623 nm (Quecksilberdampfampe) im Eppendorf Photometer gegen eine Blindlösung gemessen.

Unsere Bestimmungen zeigten, daß die Hydrolyse mit 3N Schwefelsäure wegen nicht quantitativer Spaltung des C-Glucosids nicht durchgeführt zu werden braucht. Dagegen erhöhten wir die Erhitzungsdauer im siedenden Wasserbad zur nahezu vollständigen Spaltung der C-C-verknüpften Glucose auf 20 Min.

Wir verwendeten keine Eichgerade für die Ermittlung des Glucosegehaltes, sondern führten bei jeder Versuchsreihe gleichzeitig Bestimmungen mit einer Glucoselösung durch: 9.5 mg Glucose wasserfrei (Merck Nr. 8337), genau gewogen, wurden in 100 ml Wasser gelöst; 2 ml davon wurden mit der Ammonium-reineckatlösung versetzt und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt. Dadurch wurden die erforderlichen, genau gleichen Reaktionsbedingungen für alle Proben gewährleistet.

Zum Vergleich bestimmten wir in denselben Versuchsreihen jeweils auch Aloin und berücksichtigten diesen Wert für die Berechnung bei den Cascarosiden.

Eine oxidative Hydrolyse mit FeCl_3 ist wegen einer geringen Eigenabsorption bei 623 nm nur bedingt durchführbar.

T a b e l l e 5

Mittelwert der Glucosebestimmung von
Cascarosid A und B

Substanz	Einwaage	Extinkt.	Vorh. Glucose- menge i.d. Probe	Auf Ein- waage um- ger. Glu- cosemenge
Glucose wasserfr.	9.3 mg	0.365	74.4 µg	---
Aloin	3.2 mg	0.490	104.0 µg	1.3 mg
Cascaro- sid A	3.5 mg	0.787	160.4 µg	2.05 mg
Cascaro- sid B	3.3 mg	0.743	151.2 µg	1.89 mg

Als Mittelwert ergab sich für Cascarosid A insgesamt 1.89 Mol
und für Cascarosid B 1.85 Mol Glucose.

IV. Cascarosidacetat

20 mg Substanz wurden in 1 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Es-
sigsäureanhydrid versetzt. Das Gemisch wurde 1 Std. am Mag-
netrührer gerührt und über Nacht stehengelassen. In Eiswasser
flockte eine gelbliche Substanz aus, die in Lösung eine in-
tensive gelblich-blaue Fluoreszenz zeigte.

Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel HF / Benzol-Äthylacetat (1:1) $R_f = 0.4$ UV 360 nm:
blau

IR (in KBr): Ester-CO 1740 cm^{-1} ; Keto-CO nicht mehr vorhan-
den.

NMR (CDCl_3 , TMS int.): annähernd 11 Acetylgruppen (Anthranol-
form); wahrscheinliche Veränderung der
C-C-verknüpften Glucose.

V. Isolierung von Aloeemodin-8-O-β-D-glucosid

40 mg Cascarosid wurden in 1.5 ml Pyridin p.a. gelöst, 15 Min. stehengelassen und dann papierchromatographisch (A/IV) auf 2 Bögen getrennt.

Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b, absteigend

Laufmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:17:13)

Laufzeit: 8 - 10 Stdn.

Die ungefähr 25 cm über der Startlinie bei UV 360 nm rot erscheinende Zone wurde ausgeschnitten und nach A/IV behandelt.

Nach dem Einengen zur Trockene wurde der Rückstand in etwa 4 ml Methanol p.a. aufgelöst und auf 1 - 2 ml eingeengt. Im Kühlschrank flockte eine Substanz aus, die nach dem Zentrifugieren, Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit und Trocknen über P_2O_5 bei 100°C/12 Torr kräftig gelbe Blättchen vom Schmp 237°C (Lit.: 236 - 239°C) ergab.

Chromatographie:

Alle unter A/I/1a,b und A/III für Anthraglykoside spezifischen Laufmittelsysteme

z.B.: Kieselgelkarten SIF / Äac-MeOH-Wa (100:17:13)

$$R_F = 0.47$$

$$\text{Polyamid / MeOH-Wa (3:1)} \quad R_F = 0.43$$

Testsubstanz: Aloeemodin-8-O-β-D-glucosid

VI. Strukturhinweise für Cascarosid C und D

1. Isolierung

Präparative Papierchromatographie (A/IV) der mit den Cascarosiden C und D angereicherten Fraktion der Polyamid-Säulentrennung.

2. Enzymatische Hydrolyse

Siehe S. 85

Der Niederschlag wurde nach A/I/1 und A/III chromatographisch untersucht und als Chrysophanol identifiziert.

Die Äthylacetatausschüttelung zeigte auf Kieselgel/Äac-MeOH-Wa (100:17:13) Desoxyaloin $R_f = 0.65$.

Chromatographische Identifizierung von Chrysophanol-8-O- β -D-glucosid durch Vergleich mit authentischer Testsubstanz nach A/I/1 und A/III (Anthraglykoside).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) O.E.SCHULTZ, Pharmazie 5, 501 (1950)
- 2) P.CASPARIS u. R.MAEDER, Schweiz.Apoth.-Ztg. 63, 313, 329, 341 (1925); R.MAEDER, Dissertation Basel (1925)
- 3) C.LIEBERMANN u. M.WALDSTEIN, Ber.dtsch.chem.Ges. 8, 970 (1875); 9, 1775 (1876)
- 4) O.A.OESTERLE u. Mitarb., Arch.Pharm. 249, 311 (1911); 250, 301 (1912); 253, 327 (1915)
- 5) R.EDER u. C.WIDMER, Helv.Chim.Acta 6, 966 (1923)
- 6) T.E.THORPE u. A.K.MILLER, J.Chem.Soc. 61, 1 (1892)
- 7) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.BITTNER, Pharm.Ztg. 108, 259 (1963)
- 8) G.BITTNER, Dissertation München (1963)
- 9) B.F.DLUHOSCH, Dissertation München (1964)
- 10) H.P.HÖRHAMMER, Dissertation München (1966)
- 11) H.SIEPER, R.LONGO u. F.KORTE, Arch.Pharm. 296, 403 (1963)
- 12) R.LONGO, G.MEINARDI u. F.KORTE, Arch.Pharm. 297, 248 (1964)
- 13) H.WAGNER u. H.P.HÖRHAMMER, Z.Naturforsch. 24b, 1408 (1969)
- 14) H.P.HÖRHAMMER u. H.WAGNER, Z.Naturforsch. 27b, 959 (1972)
- 15) H.MÜHLEMANN u. P.J.LYK, Pharm.Acta Helv. 45, 728 (1970)
- 16) W.PIGMAN u. D.HORTON, The Carbohydrates IIA, 228 (1970), Academic Press New York and London
- 17) S.N.KHANNA u. P.C.GUPTA, Phytochemistry 6, 735 (1967)
- 18) H.KILIANI, Chem.Ber. 63, 2866 (1930)
- 19) Ch.TAMM, Fortschr.Chem.org.Naturstoffe 13, 137 (1956)
- 20) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin S. 769 (1967)
- 21) L.MALAPRADE, Bull.Soc.chim.France 39, 325 (1926); 43, 683 (1928)
- 22) F.SMITH u. J.W.VAN CLEVE, J.Am.Chem.Soc. 77, 3091 (1955)
F.SMITH u. R.MONTGOMERY, The Chemistry of Plant Gums and Mucilages - Reinhold Publishing Corporation, New York (1959)
- 23) M.VISCONTINI, D.HOCH u. P.KARRER, Helv.Chim.Acta 38, 642 (1955)
- 24) L.HÖRHAMMER, G.BITTNER u. H.P.HÖRHAMMER, Naturwissenschaften 51, 310 (1964)
- 25) T.PURDIE u. J.C.IRVINE, J.Chem.Soc. 83, 1021 (1903)
- 26) W.N.HAWORTH, J.Chem.Soc. 107, 8 (1915)
W.N.HAWORTH, E.L.HIRST u. J.I.WEBB, J.Chem.Soc. 2681 (1928)
- 27) R.KUHN, H.TRISCHMANN u. I.LÖW, Angew.Chem. 67, 32 (1955); Chem.Ber. 88, 1492 (1955)
- 28) R.KUHN u. H.TRISCHMANN, Chem.Ber. 96, 284 (1963)
- 29) K.WALLENFELS, G.BECHTLER, R.KUHN, H.TRISCHMANN u. H.EGGE, Angew.Chem. 75, 1014 (1963)

- 30) G.AURNHAMMER, Dissertation München (1968)
- 31) G.W.HAY, B.A.LEWIS u. F.SMITH, J.Chromatog. 11, 479 (1963)
- 32) E.L.HIRST, L.HOUGH u. J.K.N.JONES, J.Chem.Soc. 928 (1949)
- 33) E. u. M.LEDERER, Chromatography, Elsevier Publishing Company Amsterdam 2.Edit., S.250 (1957)
- 34) A.McINNES, D.BALL, F.COOPER u. C.BISHOP, J.Chromatog. 1, 556 (1958)
- 35) H.W.KIRCHER, Anal.Chem. 32, 1103 (1960); Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. I, 13 (1962)
- 36) C.BISHOP u. F.COOPER, Can.J.Chem. 38, 388 (1960)
C.BISHOP, Methods Biochem.Anal. 10, 1 (1962)
Advances Carbohydrate Chem. 19, 95 (1964)
- 37) E.BAYER u. R.WIDDER, Anal.Chem. 36, 1452 (1964)
- 38) G.O.ASPINALL, J.Chem.Soc. 1676 (1963)
- 39) R.CLAMP, T.BHATTI u. R.E.CHAMBERS, Methods Biochem.Anal., 19, 229 (1971)
- 40) H.G.JONES, Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. VI, 25 (1972)
- 41) S.R.LIPSKY u. R.A.LANDOWNE, Biochim.Biophys.Acta 27, 666 (1958)
S.R.LIPSKY, R.A.LANDOWNE u. M.R.GODET, Biochim.Biophys. Acta 31, 336 (1959)
- 42) H.D.BECKEY, Angew.Chem. 81, 662 (1969)
- 43) H.KRONE u. H.D.BECKEY, Org.Mass Spectrom. 5, 983 (1971)
- 44) H.D.BECKEY, Int.J.Mass Spectrom.Ion Physics 2, 500 (1969)
- 45) R.F.MURACA, J.S.WHITTICK, G.D.DAVES, P.FRIIS u. K.FOLKERS, J.Am.Chem.Soc. 89, 1505 (1967)
- 46) K.HEYNS, H.F.GRUTZMACHER, H.SCHARMANN u. D.MÜLLER, Fortschr.chem.Forsch. 5, 448 (1966)
- 47) T.ITO, Agr.Biol.Chem. 33, 1217 (1969)
- 48) N.K.KOCHETKOV, N.S.WULFSON, O.S.CHIZHOV u. B.M.ZOLOTAREV, Tetrahedron 19, 2209 (1963)
- 49) N.K.KOCHETKOV u. O.S.CHIZHOV, Tetrahedron 21, 2029 (1965)
- 50) H.BJÖRNDAL, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Carbohyd.Res. 5, 433 (1967)
- 51) H.BJÖRNDAL, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Acta Chem.Scand. 21, 1801 (1967)
- 52) H.BJÖRNDAL, C.G.HELLERQUIST, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Angew.Chem. 82, 643 (1970)
- 53) B.HANSSON, I.JOHANSSON u. B.LINDBERG, Acta Chem.Scand. 20, 2358 (1966)
- 54) A.D.PATRICK, Nature 178, 216 (1956)
- 55) H.SANDERMANN u. H.GRISEBACH, Biochim.Biophys.Acta 156, 435 (1968); Eur.J.Biochem. 6, 404 (1968)
- 56) H.SANDERMANN, Phytochemistry 8, 1571 (1969)
- 57) E.VONGERICHTEN, Liebig's Ann.Chem. 318, 121 (1901); 321, 71 (1902)
- 58) H.GRISEBACH u. R.SCHMID, Angew.Chem. 84, 192 (1972)
- 59) M.O.FAROOQ, S.R.GUPTA, M.KIAMUDDIN, W.RAHMAN u. T.R. SESHADRI, J.Sci.Ind.Res. (India) 12B, 400 (1953); Chem. Abstr. 48, 3483d (1954)

- 60) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. H.P.HÖRHAMMER, Dtsch.Apoth.-Ztg. 107, 563 (1967)
- 61) H.MÜHLEMAN, Pharm.Acta Helv. 24, 315 (1949)
- 62) H.WAGNER, L.HÖRHAMMER u. L.FARKAS, Z.Naturforsch. 18b, 89 (1963)
H.J.LEUE, Dissertation München (1962)
- 63) L.H.BRIGGS, G.A.NICHOLLS u. R.M.L.PATERSON, J.Chem.Soc. 1718 (1952)
- 64) H.AUTERHOFF u. K.BOEHME, Arch.Pharm. 301, 793 (1968)
- 65) A.C.BELLAART, Pharm.Weekblad 97, 105 (1962)
- 66) L.HÖRHAMMER, L.FARKAS, H.WAGNER u. E.MÜLLER, Chem.Ber. 97, 1662 (1964)
- 67) A.STOLL, B.BECKER u. A.HELFFENSTEIN, Helv.Chim.Acta 33, 313 (1950)
A.STOLL u. B.BECKER, Fortschr.Chem.org.Naturstoffe 7, 248 (1950)
- 68) W.STEGLICH u. W.LÖSEL, Tetrahedron 25, 4391 (1969)
- 69) W.STEGLICH u. W.LÖSEL, Chem.Ber. 105, 2928 (1972)
- 70) R.BAUMGARTNER u. K.LEUPIN, Pharm.Acta Helv. 36, 244 (1961)
- 71) K.TSUKIDA u. N.SUZUKI, J.Pharm.Soc.Japan 75, 982 (1955)
- 72) N.Y.MARY, B.V.CHRISTENSEN u. J.L.BEAL, J.Am.Pharm.Assoc., Sci.Ed., 45, 229 (1956)
- 73) R.KINGET, Planta Med. 14, 460 (1966); 15, 233 (1967)
- 74) R.W.LIDDEL, C.G.KING u. G.D.BEAL, J.Am.Pharm.Assoc., Sci. Ed., 31, 161 (1942)
- 75) R.BAUMGARTNER u. K.LEUPIN, Pharm.Acta Helv. 36, 445 (1961)
- 76) J.W.FAIRBAIRN u. V.K.MITAL, J.Pharm.Pharmacol. 2, 432 (1957); Suppl. 10, 217T (1958)
- 77) J.W.FAIRBAIRN u. S.SIMIC, J.Pharm.Pharmacol. Suppl. 12, 45T (1960)
- 78) J.W.FAIRBAIRN, Lloydia 27, 79 (1964)
- 79) J.W.FAIRBAIRN, C.A.FRIEDMANN u. S.SIMIC, J.Pharm.Pharmacol. Suppl. 15, 292T (1963)
- 80) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, Planta Med. 6, 44 (1958)
- 81) S.MALLOV, J.M.McKIBBIN u. J.S.ROBB, J.Biol.Chem. 201, 825 (1953)
- 82) D.L.MORRIS, Science 107, 254 (1948)
- 83) L.SATTLER u. F.W.ZERBAN, Science 108, 207 (1948)
- 84) A.GERECS, Magyar.Chem.Folyóirat 36, 121 (1930); zit: W.ZINN, Dissertation Zürich (Dielsdorf 1945)
- 85) H.MÜHLEMAN, Pharm.Acta Helv. 27, 9 (1952); 27, 17 (1952)
- 86) K.MISLOW, Einführung in die Stereochemie, Verlag Chemie (1967)
- 87) E.L.ELIEL, Stereochemie der Kohlenstoffverbindungen, Verlag Chemie (1966)
- 88) G.SCHNATZKE, ORD and CD in Organic Chemistry, Heyden and Son Ltd., London (1967)
- 89) E.LÉGER, Bull.Soc.chim.France 23, 787 (1900); J.Pharm. Chim. 16, 592 (1902)

- 90) R.A.BARNES u. W.HOLFELD, Chem.and Ind. 75, 873 (1956)
- 91) M.DURAND u. R.PARIS, Ann.pharm.franc. 18, 846 (1960)
- 92) E.LÉGER, J.Pharm.Chim. 27, 5 (1908)
- 93) M.DURAND, Dissertation Paris (1958)
- 94) W.ZINN, Dissertation Zürich (Dielsdorf 1945)

Lebenslauf

Am 9. Oktober 1939 wurde ich, Günter Demuth, als Sohn des Kaufmanns Franz Demuth und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Tscherwitschke, in Dittersbach/Sudetenland geboren.

Durch die Vertreibung kam ich 1946 nach Kiefersfelden, Obb. Nach vier Jahren Volksschule in Kiefersfelden besuchte ich von 1950 bis 1959 die Oberrealschule in Rosenheim, wo ich im Juni 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend studierte ich drei Semester Maschinenbau an der Technischen Hochschule München, entschied mich aber dann für das Studium der Pharmazie. Die Praktikantenzeit leistete ich von April 1961 bis März 1963 in der St. Bonifacius-Apotheke in München ab. Im Sommer-Semester 1963 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Naturwissenschaften, ab Winter-Semester 1963/64 Pharmazie und legte im Mai 1967 das pharmazeutische Staatsexamen ab. Von Juni 1967 bis Januar 1968 arbeitete ich als Kandidat der Pharmazie in der Salin-Apotheke in Rosenheim.

Im Februar 1968 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit vorliegender Arbeit.

Bis zur Gewährung des bayerischen Promotionsstipendiums im Dezember 1970 führte ich eine regelmäßige Apothekenvertretung durch.

Die Approbation als Apotheker erhielt ich mit Wirkung vom 8. Mai 1968.

